



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Uso de *Trichoderma asperellum*, *Metarhizium robertsii* y Malatión como tratamiento mixto para el manejo del complejo de escarabajos ambrosiales

Presenta:

M. en B. Emmanuel Agustín Reynoso López

DIRECTOR: Dr. Octavio Loera Corral

ASESORES: Dr. Roberto Montesinos Matías

Dra. María Julissa Ek Ramos

CDMX, Enero 2022



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del CONACYT en el nivel de Competencia Internacional, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el No. de referencia 001466.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 27/01/2022
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA del alumno EMMANUEL AGUSTIN REYNOSO LOPEZ, matrícula 2153804269, quien cumplió con los 316 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veintiocho de enero del 2022 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Uso de *Trichoderma asperellum*, *Metarhizium robertsii* y Malatión como tratamiento mixto para el manejo del complejo de escarabajos ambrosiales

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 361 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

DR. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

Secretaria

DR. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

Vocal

DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS

Vocal

DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO
MINJAREZ



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00257

Matrícula: 2153804269

Uso de *Trichoderma asperellum*, *Metarhizium robertsii* y Malatión como tratamiento mixto para el manejo del complejo de escarabajos ambrosiales

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 28 del mes de enero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ
DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS
DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ
DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

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

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: EMMANUEL AGUSTIN REYNOSO LOPEZ

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

Aprobar

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



EMMANUEL AGUSTIN REYNOSO LOPEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

Claudia Barbosa Mtz.
DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

VOCAL

DR. ROBERTO MONTESINOS MATIAS

VOCAL

DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ

SECRETARIA

DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

Agradecimientos

A mi familia. A mis preciados padres y hermanos.

A toda la UAM.

A Octavio Loera por sus valiosos consejos y enseñanzas. A Roberto Montesinos por su gran compañerismo, análisis y a su hermosa familia. A Jazmín Méndez por su enorme entereza y ánimos en la escritura del artículo. A Julissa por su apoyo y palabras de aliento. A las grandes reflexiones con mi hermano y compañero Miguel Castillo. A los buenos debates y consejos de Gustavo Viniegra.

Un enorme agradecimiento a Claudia Barbosa por su apoyo y ser la profesora más linda de todas. A los profesores Cristina Acosta y José Sepúlveda del Laboratorio de Microscopía Electrónica. A Tania Volke de Fitorremediación. A la profesora María del Carmen de Entomología. A los compañeros de Biología Molecular. A los profesores Manuel Castillo y Kobelkowsky de Ictiología.

Al CNRCB por su gran apoyo y al hermoso estado de Colima por cobijar a un chilango.

A mis compañeros de laboratorio Miguel, Neko, Jorge, Gera, Nemi, Jaz, Paco, Vicky, Facundo, Nohemí, Norber, Bris, Arturo, Citlaly, Dan T., siempre disfrutando de los tremendos debates con Miguel y Neko sobre ciencia, vida, arte y sus convergencias.

A mis amigos del posgrado en Biotecnología Yowas, Fer, Mons, Caro, Carlos, Moni.

A mis compañeros de la UAM con quienes disfruté este hermoso camino desde la licenciatura hasta el doctorado.

A mis amigos que han estado..., donde nuestros caminos se cruzan y otras veces se dividen, pero siempre permaneciendo en mi corazón.

A mis hermanos del alma Diego Fabián, Huitzi, Miguel Corona.

A Eli por un tremendo 2021.

Al coro de la UAM-I y a la profesora Angélica por tanta pasión musical.

A los amigos y compañeros de salsa, gracias por enseñarme ese lenguaje corporal.

A quienes hacen la comida cerca de la UAM-I o en las instalaciones de la misma, disfrutándola sin enfermarse.

En general a toda la comunidad universitaria que goza, estudia, trabaja y que nunca se rinde..., siempre explotando cada día como si fuera el último.

Y esperando que ya se acabe la pandemia para volver a disfrutar todos juntos de esa sensación al caminar por los pasillos y edificios de esta gran universidad, casa abierta al tiempo.

Gracias

Índice

Resumen.....	6
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	17
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	20
5.1 Objetivos generales.....	20
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. Materiales y métodos.....	21
6.1 Estrategia experimental.....	21
6.2 Microorganismos.....	22
6.3 Obtención y mantenimiento del escarabajo <i>Xyleborus affinis</i>	23
6.4 Pruebas de confrontación fúngica.....	26
6.5 Pruebas de Tolerancia al plaguicida Malatión.....	27
6.6 Bioensayo con <i>Xyleborus affinis</i>	28
6.7 Análisis estadístico.....	29
7. Resultados.....	30
7.1 Pruebas de confrontación fúngica.....	30
7.2 Pruebas de Tolerancia al plaguicida Malatión.....	34
7.3. Bioensayos con <i>Xyleborus affinis</i>	37
8. Discusión.....	38
9. Conclusión.....	43
10. Perspectivas.....	43
Referencias.....	44
Anexos.....	53

Resumen

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial, por lo tanto, la reciente entrada de complejos ambrosiales exóticos representa un peligro latente para la cadena de producción de este fruto. Estos complejos son responsables de la enfermedad vascular letal conocida como *marchitez del laurel* y de la muerte regresiva por *Fusarium* o “*Fusarium dieback*”. Se ha reportado el potencial de algunos agentes de control biológico y plaguicidas químicos para controlar estos complejos, sin embargo, a la fecha no existe un tratamiento completamente efectivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto antagonista de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) sobre el hongo ambrosial exótico *Fusarium euwallaceae* 744 y el hongo simbiote *Fusarium* sp. aislado de *Xyleborus affinis* Eichhoff. El hongo *T. asperellum* Th-T4 (3) invadió y penetró a *F. euwallaceae* 744, y disminuyó la velocidad de crecimiento de *Fusarium* sp. También se utilizó el plaguicida Malatión, que se emplea comúnmente para controlar a los complejos ambrosiales. Sin embargo, se ha reportado que el uso de este plaguicida ocasiona problemas a la salud humana y al agroecosistema. Por lo tanto y como posible componente para una estrategia combinada, se utilizaron diferentes mezclas entre Malatión, a menores dosis de las recomendadas, con los agentes biológicos *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) como micopatógeno y *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 como entomopatógeno. Una de las pruebas de compatibilidad en los agentes biológicos, fue la tolerancia al plaguicida, siendo *T. asperellum* Th-T4 (3) más tolerante a Malatión que *M. robertsii* Xoch 8.1. Para corroborar el impacto que tienen los diferentes tratamientos, se realizaron bioensayos con el escarabajo ambrosial modelo *X. affinis*, cuyo ciclo biológico es similar al de las plagas exóticas, esto con tres propósitos fundamentales: **a)** controlar poblaciones plaga de *X. affinis*; **b)** anular el peligro de usar una plaga latente de complejo ambrosial ya presente en la frontera norte, Baja California, México y California, EUA (*Euwallaceae* nr. *fornicatus*/*Fusarium euwallaceae*); y **c)** ya que los complejos ambrosiales son promiscuos y pueden transmitir los simbiontes entre diferentes especies de escarabajos ambrosiales (transferencia lateral), tener una estrategia preventiva en el caso de intercambio de especies. Los resultados de los bioensayos en contacto con *M. robertsii* Xoch 8.1 solo o en combinación con *T. asperellum* Th-T4 (3) mostraron una mortalidad promedio del 76%, sin diferencias significativas con el uso de Malatión a 600 ppm. Además, la aplicación del tratamiento combinado de Malatión (a 60 ppm o 200 ppm) con los hongos *M. robertsii* Xoch 8.1 más *T. asperellum* Th-T4 (3), fue tan eficiente como el Malatión solo a 600 ppm. Por lo tanto, el tratamiento únicamente con *M. robertsii* Xoch 8.1 o en combinación con *T. asperellum* Th-T4 (3), o con Malatión en dosis bajas, puede ser tan efectivo como el tratamiento con Malatión a 600 ppm, esto es

relevante en aquellas aplicaciones en campo donde el Malatión persiste en los cultivos, o cuando se requiere un efecto sinérgico para controlar insectos plaga. La estrategia propuesta reduce la concentración recomendada de Malatión hasta un orden de magnitud, y es efectiva para contener a *X. affinis* bajo las condiciones ensayadas. Además, una estrategia que sustituya parcial o totalmente el uso del plaguicida químico, contribuye a la preservación del agroecosistema y por lo tanto es una alternativa sustentable.

1. Introducción

México es el principal productor de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) (Lurales: Lauraceae) a nivel mundial, con una producción anual de 2.3 millones de toneladas según lo registrado en el 2019 (FAO, 2021), con un valor de exportaciones estimado en \$ 39.7 mil millones de pesos (SADER-SENASICA, 2019a). El estado de Michoacán, es el mayor productor de aguacate, con un valor estimado de 1.57 millones de toneladas, una superficie sembrada de 159 mil hectáreas y con una derrama económica de \$ 32.8 mil millones de pesos (SADER-SENASICA, 2019a). La reciente entrada de los complejos ambrosiales exóticos, incluyendo al escarabajo y por lo menos un hongo simbionte, de *Xyleborus glabratus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae)/*Raffaelea lauricola* (Ophiostomatales: Ophiostomataceae), y *Euwallacea* nr. *fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae)/*Fusarium euwallaceae* (Hypocreales: Nectriaceae), representa un peligro latente para los productores de este fruto, ya que el aguacate se encuentra entre los principales anfitriones de los complejos ambrosiales (Stouthamer *et al.*, 2017; SENASICA, 2020). Se afectaría a cerca de 11,727 productores de aguacate establecidos en el país, por lo que se pondrían en riesgo 187 mil empleos directos, los cuales benefician a más de 70 mil familias en Michoacán (SADER-SENASICA, 2019b).

Los complejos ambrosiales nativos construyen sus galerías barrenando árboles enfermos o viejos, rara vez atacan árboles sanos. Una vez invadidos, las hembras colonizadoras vuelan en busca de otros árboles. No obstante, la procedencia del complejo ambrosial exótico es asiática, se cree que pudieron haber llegado por las embarcaciones en las materias que contenían madera (Eskalen *et al.*, 2013). Cabe mencionar que el peligro del complejo ambrosial exótico es que además de la materia vieja o en descomposición, logran invadir a los árboles sanos, con la posibilidad de diezmar poblaciones enteras en poco tiempo. Tal es el caso de *Xyleborus glabratus* que ha generado pérdidas enormes en Lauraceas incluyendo aguacate en EUA (Eskalen *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2014). En 2015 el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Fitosanitaria (SINAVEF) incluyó por primera vez a los complejos ambrosiales *X. glabratus*/R. *lauricola* y *E. nr. fornicatus*/F. *euwallaceae* dentro de las plagas de riesgo de introducción a México (SAGARPA-SENASICA, 2016). De hecho, el complejo *E. nr. fornicatus*/F. *euwallaceae* ya se ha reportado en Tijuana (Montesinos-Matías *et al.*, 2019), Rosarito, Ensenada y Tecate, Baja California (Fig. 1.1) (SADER-SENASICA, 2018).

El complejo simbiótico *X. glabratus*/R. *lauricola* es el responsable de una enfermedad vascular letal conocida como “marchitez del laurel” (Fig. 1.2), mientras que el complejo *E. nr. fornicatus*/F.

euwallaceae es responsable de la muerte regresiva por *Fusarium* o “*Fusarium dieback*” (SAGARPA-SENASICA, 2016), donde básicamente el hongo bloquea los canales vasculares de las plantas (Fig. 1.3) (Hulcr y Stelinski, 2017). Como parte del ciclo biológico de estos complejos, los hongos ambrosiales como *F. euwallaceae* son el alimento de larvas y escarabajos ambrosiales dentro de las galerías de los árboles infectados (Montesinos-Matías *et al.*, 2019; Castrillo *et al.*, 2016).

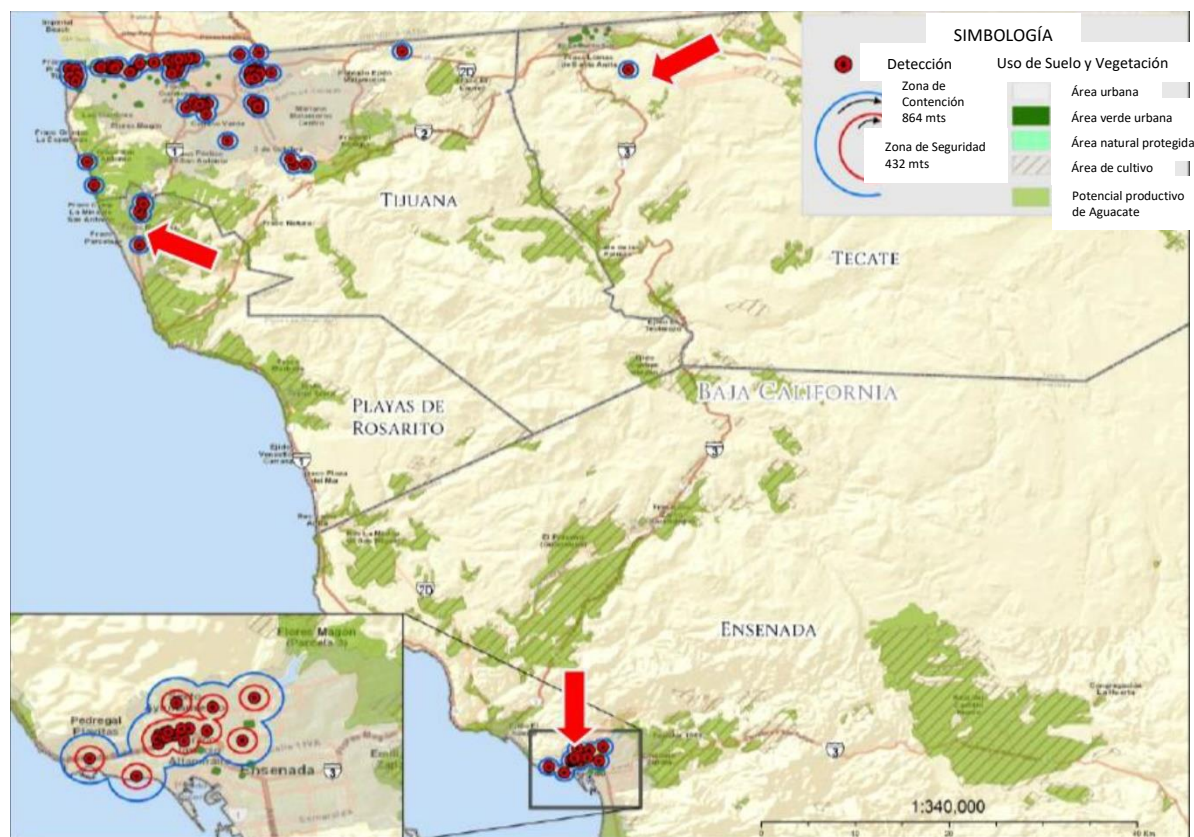


Fig. 1.1. Detecciones de *E. nr. fornicatus* en el estado de Baja California.
Fuente: SADER-SENASICA, 2018.

Se han reportado a más de 300 especies de árboles atacados por el complejo ambrosial *E. nr. fornicatus*/*F. euwallaceae*, de estos más de 110 son susceptibles a la muerte regresiva por *Fusarium* (Kabashima y Dimson, 2014). Aunque no se sabe si el escarabajo ambrosial *E. nr. fornicatus* es capaz de reproducirse en estas especies, puede inocular los hongos simbióticos iniciando la infección en los árboles (Tabla 1.1) (Eskalen *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2014). En México, el escarabajo ambrosial *Xyleborus affinis* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae) y sus hongos simbióticos, habitan

naturalmente en plantaciones de aguacate teniendo un impacto mínimo en los cultivos, sin embargo, estos complejos nativos son susceptibles a la transferencia lateral de los simbiosntes por los complejos ambrosiales invasores (Carrillo *et al.*, 2014), que son un riesgo potencial en las plantaciones de aguacate, además de la gran diversidad de plantas reportadas como hospedantes reproductivos y susceptibles al ataque, tanto de importancia agrícola (Tabla 1.2 y Fig. 1.4) (SADER-SENASICA, 2019b), como forestal y ornamental (Lira-Noriega *et al.*, 2018).

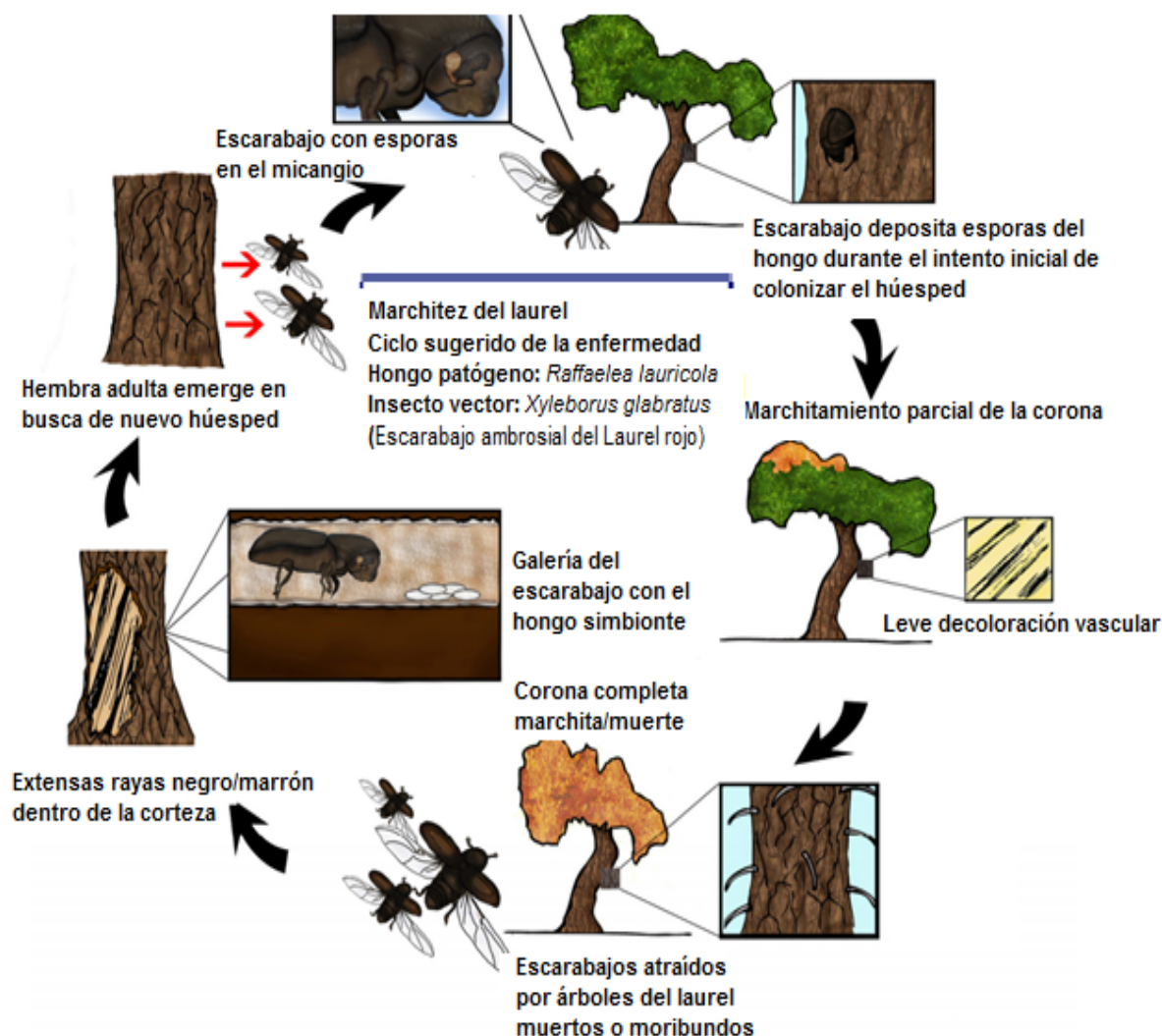


Fig. 1.2. Ciclo de la enfermedad del marchitamiento del laurel ocasionada por el escarabajo ambrosial *X. glabratus* atacando un árbol huésped saludable. El hongo simbiote *R. lauricola* se introduce en el árbol, y a medida que crece el árbol comienza a mostrar signos de enfermedad.

Eventualmente ocurre la muerte del árbol, y un nuevo grupo de escarabajos emerge para encontrar nuevos árboles anfitriones (tomado de Hughes *et al.*, 2014).

Tabla 1.1. Especies hospedantes y susceptibles del complejo *E. nr. fornicatus*/*F. euwallaceae*.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Aguacate
Sapindaceae	<i>Acer negundo</i>	Arce negundo
Sapindaceae	<i>Acer macrophyllum</i>	Arce de hoja grande
Sapindaceae	<i>Acer buergerianum</i>	Arce tridente
Sapindaceae	<i>Acer palmatum</i>	Arce japonés palmeado
Sapindaceae	<i>Alectryon excelsus</i>	Titoki
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla
Platanaceae	<i>Platanus racemosa</i>	Sicómoro de California
Fagaceae	<i>Quercus robur</i>	Roble común
Fagaceae	<i>Quercus agrifolia</i>	Encino de la costa
Fagaceae	<i>Platanus x acerifolia</i>	Plátano de sombra
Fagaceae	<i>Quercus engelmannii</i>	Roble Engelmann
Fagaceae	<i>Quercus lobata</i>	Roble de los valles
Moraceae	<i>Ficus macrophylla</i>	Moretón
Salicaceae	<i>Salix laevigata</i>	Sauce
Salicaceae	<i>Populus fremontii</i>	Álamo de Virginia
Salicaceae	<i>Populus trichocarpa</i>	Álamo negro
Betulaceae	<i>Alnus rhombifolia</i>	Betulácea
Fabaceae	<i>Albizia julibrissin</i>	Árbol Coral
Fabaceae	<i>Cercidium floridum</i>	Palo verde
Fabaceae	<i>Parkinsonia aculeata</i>	Brea
Fabaceae	<i>Castanospermum australe</i>	Mesquite amargo
Fabaceae	<i>Prosopis articulata</i>	Glicinia japonesa
Fabaceae	<i>Acacia spp.</i>	Acacia
Theaceae	<i>Camellia semiserrata</i>	Camelia
Altingiaceae	<i>Liquidambar styraciflua</i>	Liquidámbar

Fuente: Eskalen *et al.*, 2013; SADER-SENASICA, 2019b.

Tabla 1.2. Producción agrícola nacional de los hospedantes potenciales de *E. nr. fornicatus* y *F. euwallaceae* en México.

Cultivo	Superficie sembrada (Ha)	Producción (Ton)	Valor de producción (Millones de pesos)
Hospedante reproductivo			
Aguacate	218,492.93	2,029,885.85	39,705.96
Hospedantes para el desarrollo del hongo			
Aceituna	7,351.45	12,879.38	139.96
Durazno	31,281.22	163,795.96	1,340.83
Jaca	1,509.70	22,192.83	143.95
Macadamia	1,484.50	3,067.81	63.86
Naranja	335,425.69	4,629,758.18	8,621.73
Níspero	13.99	69.45	0.27
Nuez	123,346.30	147,198.48	11,407.03
Papaya	18,771.99	961,768.25	4,948.23
Persimonio	9	52.8	0.92
Uva	33,713.64	415,889.20	7,279.73
Zapote chilero	182	0	0
Total	771,582.41	8,386,558.19	73,652.47

Fuente: SADER-SENASICA, 2019b (con datos del 2017); Gomez *et al.*, 2019.

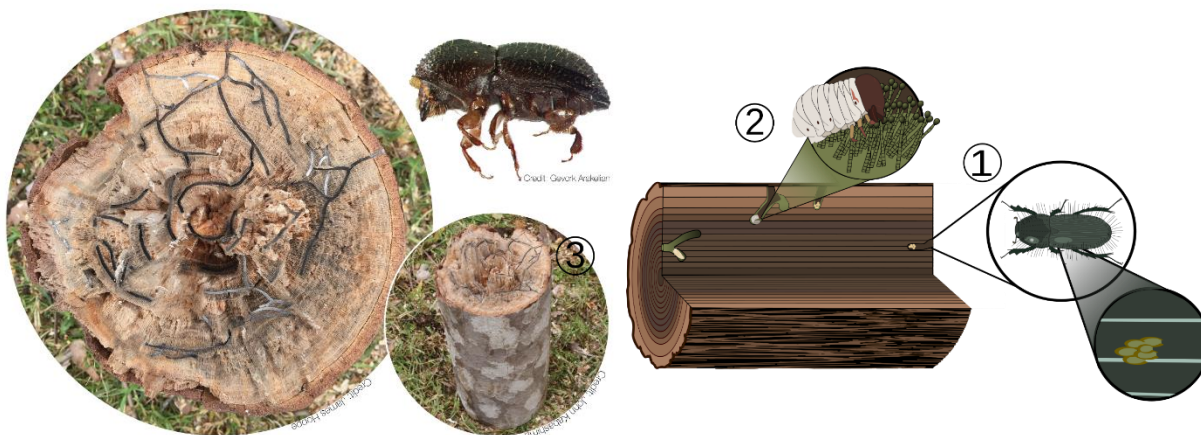


Fig. 1.3. Escarabajo ambrosial barrenador polífago *E. nr. fornicatus* en simbiosis con *F. euwallaceae*. 1) El ciclo inicia cuando la hembra colonizadora entra en contacto con el tronco de un árbol y lo barrena, ovipositando y propagando su hongo ambrosial simbiote *F. euwallaceae*, que se encuentra localizado en los micangios de los escarabajos; 2) El hongo ambrosial sirve de alimento tanto a larvas como a insectos adultos; 3) Daño de un tronco de árbol ocasionado por galerías de *E. nr. fornicatus* y el hongo *F. euwallaceae*

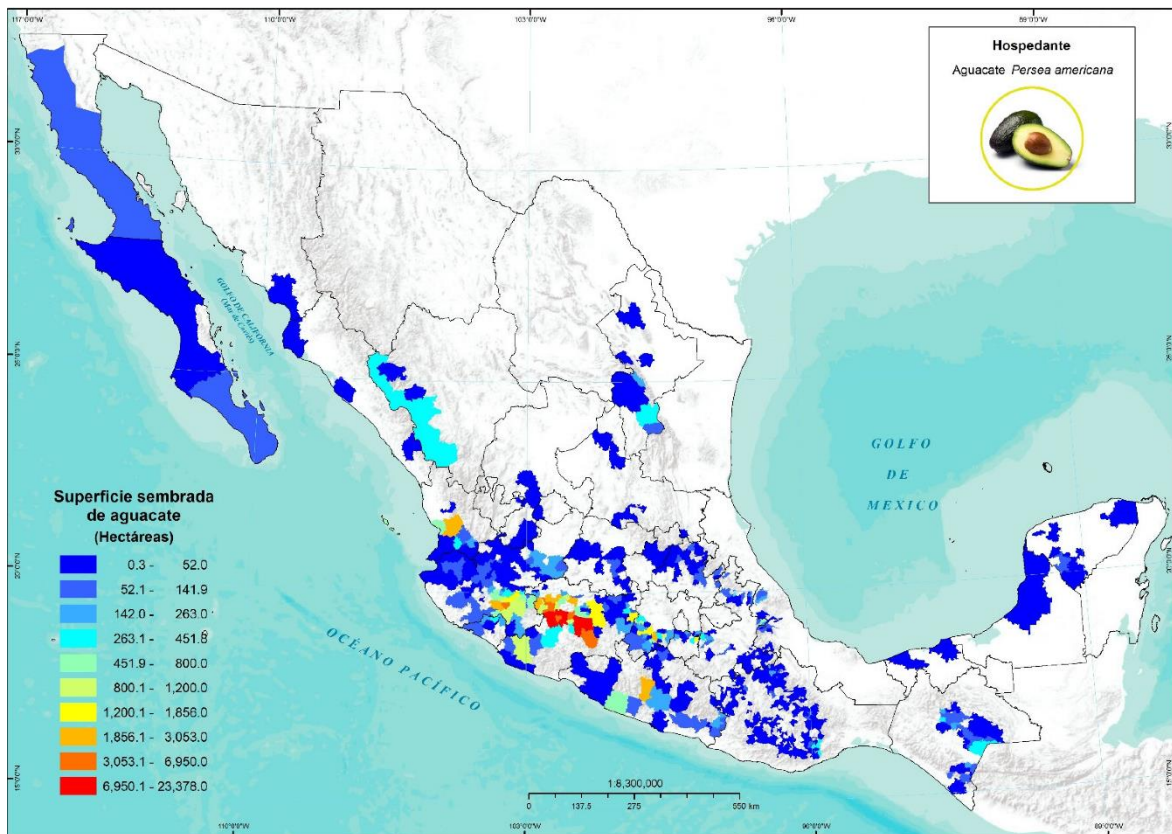


Fig. 1.4. Superficie cultivable de aguacate, hospedante potencial para el establecimiento y desarrollo de *E. nr. fornicatus* y *X. glabratus*. Los estados con mayor riesgo, Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit y Guerrero (SADER-SENASICA, 2019b).

Como medida de control de los complejos ambrosiales, se han probado algunos plaguicidas químicos como Malatión (Fig. 1.5), Permitrina y Carboxin en *P. americana* (Carrillo *et al.*, 2013), además de benzoato de emamectina, Bifentrina, Metconazol y triazoles en *Platanus racemosa* Nutt. (sicomoro) (Proteales: Platanaceae) infestado por *Euwallacea* sp. (Eatough Jones *et al.*, 2017; Grosman *et al.*, 2019). Aunque el uso de plaguicidas químicos actúa de manera inmediata sobre el área donde es asperjado, un inconveniente de esta práctica, es que diezman la comunidad de organismos tanto “plagas” como “no objetivos” (Aktar *et al.*, 2009), lo cual representa un efecto perjudicial para el ecosistema (Mulla *et al.*, 1981; Akhgari *et al.*, 2003), además de problemas en la salud humana por el uso excesivo de plaguicidas como el Malatión (Baker *et al.* 1978; Singh *et al.*, 2013). Además, por reglamentación, los productores de cultivos orgánicos (incluyendo el aguacate), no pueden usar productos químicos para mitigar las plagas (Aktar *et al.*, 2009; SENASICA, 2020).

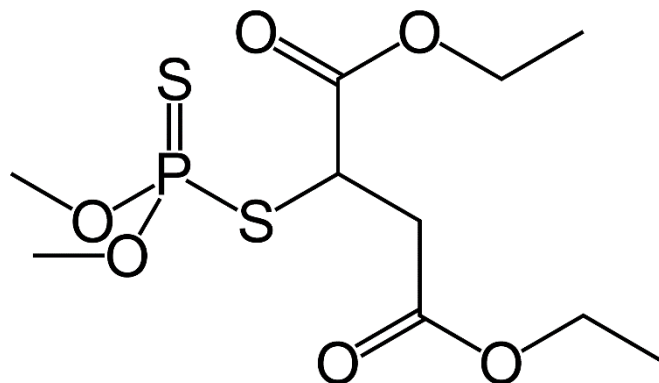


Fig. 1.5. Diagrama químico del plaguicida Malatión. Fuente: Sigma-Aldrich

En México, el Malatión actualmente cuenta con registro sanitario ante la COFEPRIS (2022), pudiéndose usar en las plantaciones de aguacate (SAGARPA-SENASICA 2016; Crane *et al.*, 2020), ya que es reconocido como el primer insecticida organofosforado con alta toxicidad (Shan *et al.*, 2009; Goda *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013); este compuesto está clasificado como plaguicida de toxicidad de clase III, con una concentración residual máxima de 8 ppm autorizada en cultivos y alimentos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (Singh *et al.*, 2013). En un estudio de invernadero, el Malatión a las dosis recomendadas se detectó fácilmente en la superficie de las plantas después de 9 semanas de su aspersión (Delmore y Appelhans, 1991). Además, aparece con frecuencia en alimentos para humanos y animales (Singh *et al.*, 2013), y es absorbido por el tracto gastrointestinal, la piel, las membranas mucosas y los pulmones (Kaur *et al.*, 1997), causando enfermedades (Baker *et al.*, 1978) posiblemente vinculadas al cáncer (Akhgari *et al.*, 2003). Singh *et al.* (2013), mencionó que la degradación del Malatión por microorganismos demuestra ser un método eficaz para recuperar zonas del medio ambiente dañadas.

Según datos de la Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate en Uruapan, Michoacán, México (APROAM), y el Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM), el kilo de aguacate oscila entre los \$ 0.3-2.0 dólares para su venta nacional dependiendo de la calidad, variedad y proveedor (APROAM, 2021; SNIIM, 2021). Con respecto a la exportación, los precios varían entre los \$ 0.66-3.5 dólares para EUA y entre \$ 1.6-1.9 dólares para Japón. Se ha reportado que solamente México, Nueva Zelanda y EUA exportan aguacate a Corea, de acuerdo con datos de la Korea Custom Service en el 2017 (Premack, 2017). La variación en el costo de la producción de aguacate orgánico en México puede generar una alta variación en los precios

principalmente en el mercado asiático, siendo el mercado sur-coreano de reciente interés, lo que implica un valor de importación de hasta \$ 2.4 millones de dólares por año, que repercute en que el aguacate es ya una tendencia en el menú coreano, teniendo un costo de entre \$ 3-4 dólares por aguacate (Premack, 2017). Por lo tanto y sumado a que los productores orgánicos no pueden emplear insumos de plaguicidas químicos, se ha recomendado limitar o disminuir, estos plaguicidas como agentes de control biológico, tanto en plantaciones de aguacate como en otros cultivos, y en casos de mayor toxicidad, hasta la prohibición en su uso tanto en México como en EUA (United States Department of Agriculture [USDA], 2016; SAGARPA-SENASICA 2016).

Otro inconveniente al usar plaguicidas químicos en los escarabajos ambrosiales, son los hábitos crípticos de estos escarabajos, que pasan poco tiempo en la superficie del árbol, lo que limita su contacto con los plaguicidas (Eatough Jones *et al.*, 2017). Por ello, se deben explorar alternativas sostenibles para el control de plagas y enfermedades, ya que no se conocen tratamientos insecticidas que brinden control por tiempo suficiente, y tampoco fungicidas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos dentro de árboles infestados (Grosman *et al.*, 2019), considerando tanto su efectividad como el grado de inocuidad en el ambiente.

El uso de enemigos naturales, como un componente del Manejo Integral de Plagas, es un método de control de plagas tales como insectos, ácaros, malezas y enfermedades de la planta usando otros microorganismos (Barratt *et al.*, 2018). Es una alternativa al uso de los agroquímicos o plaguicidas (Fig. 1.6). Por un lado, los hongos entomopatógenos (HE) son agentes de control biológico que de forma natural pueden causar enfermedad en los insectos, llevando a la generación de epizootias. Los HE como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae), y *Metarhizium brunneum* Petch (Hypocreales: Clavicipitaceae), han sido probados en los escarabajos ambrosiales *Xylosandrus crassiusculus* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), y *Xylosandrus germanus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae), presentando una alta infectividad en el insecto (Castrillo *et al.*, 2016). Por otro lado, existen hongos micopatógenos como *Trichoderma harzianum* Rifai (Hypocreales: Hypocreaceae), que disminuyen la invasividad de hongos ambrosiales como *Ambrosiella roeperi* (Microascales: Ceratocystidaceae), y *Ambrosiella grosmanniae* (Microascales: Ceratocystidaceae) (Castrillo *et al.*, 2016). *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf y Nirenberg (Hypocreales: Hypocreaceae), también atacan especies fitopatógenas del género *Fusarium* (Fig. 1.7) (Viterbo y Horwitz, 2010; El_Komy *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que especies de *Trichoderma* presentan cierta tolerancia a plaguicidas químicos como el



Fig. 1.6. Productos comerciales que tienen como ingrediente activo hongos de control biológico como alternativa a los plaguicidas químicos. **A)** Formulad Met52EC con *Metarhizium anisopliae* f32 (Novozymes Biologicals Inc., EUA). **B)** Formulad TRI-SIN con 3 hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Agrobionsa, México). **C)** Formulad de *T. harzianum* (Grow Depot, México).

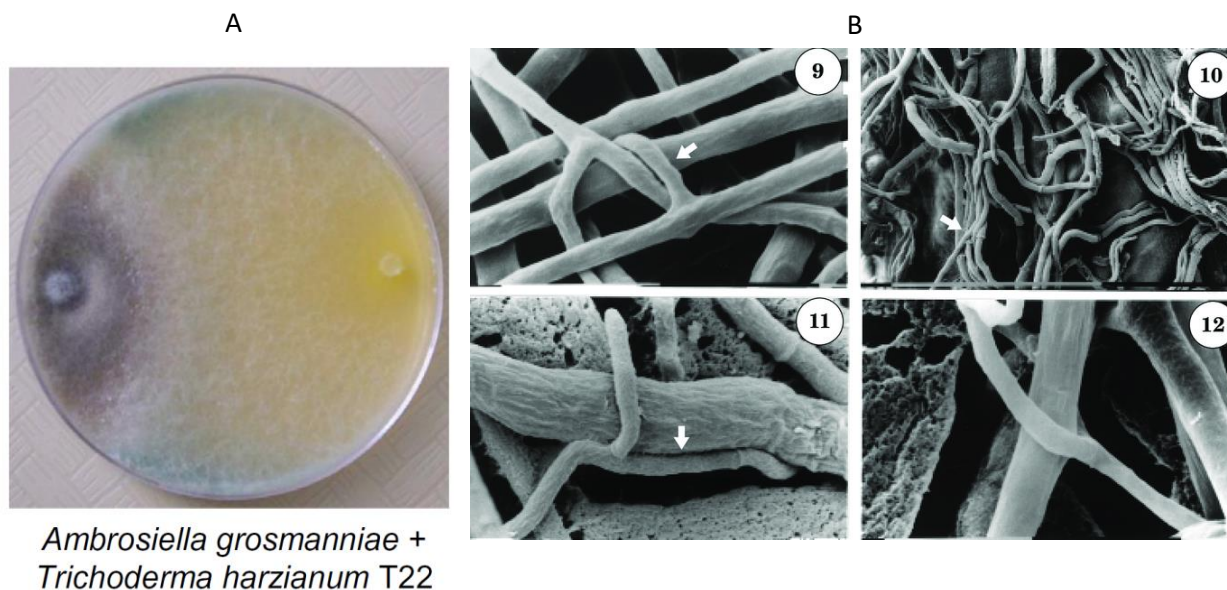


Fig. 1.7. Acción micoparásita de **A)** *T. harzianum* T22 (verde-amarillo) invadiendo el área de crecimiento del hongo ambrosial *A. grosmanii* (gris) (Castrillo *et al.*, 2016), **B)** Micrografías de *T. harzianum* TH144 invadiendo y envolviendo a *Fusarium* sp. (Pisi *et al.*, 2001).

Malatión; esta tolerancia está relacionada principalmente a la producción de enzimas como proteasas y esterases (Katayama y Matsumura, 1993; Mishra *et al.*, 2016), incluyendo el gen *zfc1* “zinc finger chimera 1”, junto con oxidorreductasas y transportadores ABC con la función de tolerar el estrés causado por el plaguicida químico Diclorvos a *T. asperellum* TJ01 (Wu *et al.*, 2018). También se han reportado cepas de *Trichoderma viride* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae), con la capacidad de descomponer el Malatión a través de la acción de la carboxilesterasa (Matsumura y Boush, 1966; Singh *et al.*, 2013), por un proceso de desmetilación (Mostafa *et al.*, 1972), o por otras posibles vías de degradación (Paris *et al.*, 1975; Goda *et al.*, 2010). *Trichoderma* spp. no es el único género degradador de compuestos químicos, *Aspergillus fumigatus* Fresenius (Eurotiales: Trichocomaceae), *Aspergillus terreus* Thom (Eurotiales: Trichocomaceae), *Aspergillus niger* van Tieghem (Eurotiales: Trichocomaceae), *Penicillium notatum* Thom (Eurotiales: Trichocomaceae), y *Acinetobacter johnsonii* Beijerinck (Pseudomonadales: Moraxellaceae), se han aislado comúnmente de suelos contaminados con plaguicidas, teniendo la capacidad para degradar organofosfatos (Mostafa *et al.*, 1972; Shan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019). Esto representa una gran alternativa para usar microorganismos para facilitar la biodegradación y limpieza de los sistemas cultivo, teniendo en cuenta la posibilidad de usar a *T. asperellum* y *Metarhizium robertsii* Bisch., Rehner y Humber (Hypocreales: Clavicipitaceae), con la ventaja de ser micopatógenos y entomopatógenos respectivamente, e incluso endófitos (Sasan y Bidochka, 2012; Carro-Huerga *et al.*, 2020).

Se ha reportado el potencial de algunos agentes de control biológico y plaguicidas químicos para controlar los complejos ambrosiales, sin embargo, a la fecha no existe un tratamiento completamente efectivo (Carrillo *et al.*, 2013; Castrillo *et al.*, 2016). Por ejemplo, no se ha probado el uso de agentes de control biológico como los hongos en conjunto con plaguicidas para combatir a los complejos ambrosiales. Por lo que esta es una oportunidad para probar la posibilidad de disminuir la concentración de Malatión como agente químico de control.

2. Antecedentes

En EUA, se han reportado ataques a los cultivos de la familia Lauraceae, incluyendo *Persea americana* (aguacate), las dos enfermedades principales son “el marchitamiento del laurel” y “dieback” o sequía por *Fusarium*, en Florida y California, respectivamente, ambas enfermedades son causadas por un agente micótico en simbiosis con especies de escarabajos ambrosiales (Dunlap

et al., 2016). Para contrarrestar esta situación, una de las principales propuestas es el empleo de microorganismos, ya sean entomopatógenos para controlar a las poblaciones de escarabajos ambrosiales, micopatógenos para controlar al simbiote causante de la enfermedad, y/o endófitos que mejoren el crecimiento vegetal (Castrillo *et al.*, 2016; Dunlap *et al.*, 2016). Se han reportado tres especies de *Paenibacillus* Ash (Bacillales: Paenibacillaceae), y una especie de *Bacillus* Cohn (Bacillales: Bacillaceae), con una fuerte actividad antagónica en contra de los fitopatógenos *F. euwallaceae* y *R. lauricola* (Dunlap *et al.*, 2016). Además, existen especies de *Trichoderma* que actúan como micopatógenos de especies de *Fusarium* y otros hongos ambrosiales (Castrillo *et al.*, 2016).

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en 2020, reportó que los complejos de escarabajos ambrosiales del laurel rojo con su simbiote (*X. glabratus*/*R. lauricola*), y del escarabajo barrenador polífago con su simbiote (*E. nr. fornicatus*/*F. euwallaceae*), son plagas potenciales para la producción de aguacate, además de otros hospedantes.

El escarabajo barrenador polífago, conocido también por su nombre en inglés como *Polyphagous Shot Hole Borer* (PSHB), es originario del sudeste de Asia y es vector de *F. euwallaceae*, *Graphium* sp. Corda (Microascales: Microascaceae), y *Acremonium* sp. Link (Hypocreales: Hypocreaceae), asociación que provoca la enfermedad conocida como marchitez regresiva de *Fusarium*. La plaga está presente en California (EUA) e Israel, el primer reporte en México ocurrió en febrero de 2015 en Tijuana, Baja California, posteriormente, se registró en 2017 en Rosarito, Ensenada y Tecate del mismo estado. En el resto del país, la plaga se encuentra ausente por el momento.

Con respecto al escarabajo ambrosial *X. glabratus*, los resultados del Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria y con base en la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) No. 8, “*Determination of pest status in an area*”, el estatus del escarabajo ambrosial del laurel rojo (*X. glabratus*) se mantiene en ausente: no hay registro de la presencia de la plaga (SADER-SENASICA, 2019a). *Xyleborus glabratus* cumple con la definición de **plaga cuarentenaria**, ya que se encuentra ausente en el país y puede potencialmente causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes (SADER-SENASICA, 2019a), debido al potencial vector *Xyleborus volvulus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae) (portador de simbioses no patógenos), con el simbiote *R. lauricola* que afecta los cultivos de aguacate en Florida del Sur, EUA, debido a la falta de fidelidad y fácil

asociación que *X. volvulus* ha presentado con los simbiontes de *Raffaelea* spp. (Cruz *et al.*, 2019). Se han reportado especies nativas de *Xyleborus* atacando árboles de *P. americana* en Colima, México, como *X. affinis*, *X. volvulus*, y *X. spinulosus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae) (Fig. 2.1) (Ángel-Restrepo *et al.*, 2019; Castrejón-Antonio *et al.*, 2020), lo cual presenta el riesgo de combinación con los escarabajos exóticos, debido a que puede haber transferencia lateral por la promiscuidad, adaptación y capacidad de almacenar más de un organismo simbiote que poseen los escarabajos ambrosiales (Carrillo *et al.*, 2014).

Ante esta amenaza para industria de aguacate, diversas instituciones entre ellas el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) ubicado en Colima, México, junto con otras instituciones como la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), se encuentran colaborando para llevar a cabo acciones preventivas relacionadas con el control biológico para contrarrestar el peligro potencial que representan los complejos ambrosiales.



Fig. 2.1. A) *Xyleborus affinis*, B) *X. volvulus* y C) *Xyleborus ferrugineus*. Escala de la barra: 1 mm (Ángel-Restrepo *et al.*, 2019).

3. Justificación

El aguacate es uno de los principales productos en México a nivel nacional y mundial, siendo Michoacán el principal productor del país, este fruto se encuentra potencialmente en peligro por la entrada de los complejos ambrosiales exóticos (SAGARPA-SENASICA 2016). Además, un buen porcentaje del producto que se exporta a países asiáticos como Corea y Japón tiene certificación orgánica, por lo que requiere permisos internacionales, cuya principal característica es que debe estar libre de residuos de plaguicidas químicos. La importancia del crecimiento de este mercado libre de plaguicidas tiene repercusiones ecológicas importantes pues se convierte en una estrategia

sustentable y a favor de la inocuidad alimenticia, evitando problemas en la salud humana, ya que se han reportado relaciones entre el uso de plaguicidas y enfermedades respiratorias, digestivas e incluso ligadas a enfermedades cancerígenas (Singh *et al.*, 2013).

El uso de agentes de control biológico como los HE y los hongos micopatógenos como parte integral del control biológico de plagas son una alternativa viable para disminuir el uso de plaguicidas químicos y sus repercusiones ambientales. Algunos de estos agentes de control biológico, también pueden actuar también como endófitos de plantas (Sasan y Bidochka, 2012), proporcionando una ventaja adicional a su uso en campo, debido a que pueden proporcionar protección a las plantas contra factores estresantes como la sequía y organismos patógenos (Vega *et al.*, 2018) entre otros beneficios. Tal es el caso del efecto sinérgico entre *T. asperellum* y *B. bassiana* como inductores en la defensa del maíz (*Zea mays* L.) (Poales: Poaceae) (Batool *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado el uso de una estrategia combinada entre agentes de control biológico como son los hongos y los plaguicidas químicos, con la idea de reducir en mayor medida el uso de agentes químicos. En este trabajo se propone el uso de los agentes *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), tanto de manera individual como conjunta, además de una estrategia sustentable y preventiva para controlar el avance de los complejos ambrosiales.

4. Hipótesis

El hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y el micopatógeno *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), son tan efectivos solos o combinados como el plaguicida químico Malatión para controlar al escarabajo ambrosial modelo *Xyleborus affinis* y su simbionte *Fusarium* sp., así como para controlar al hongo ambrosial *Fusarium euwallaceae* 744.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

- a) Comparar la mortalidad del escarabajo ambrosial *X. affinis* en bioensayos, empleando conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3) de forma individual o combinada con Malatión, para evaluar su efectividad.

- b) Determinar el efecto de *T. asperellum* Th-T4 (3), al confrontarlo con el hongo ambrosial *F. euwallaceae* 744 y con el hongo *Fusarium* sp. simbionte del escarabajo ambrosial *X. affinis*.

5.2 Objetivos específicos

- a) Preservar las cepas de hongos mediante la técnica de liofilización para su disponibilidad a largo plazo.
- b) Seleccionar los agentes de control biológico idóneos, capaces de contener al complejo ambrosial.
- c) Cuantificar el grado de tolerancia a Malatión para cada hongo.
- d) Determinar el efecto de *T. asperellum* Th-T4 (3) sobre el hongo ambrosial *F. euwallaceae* 744, mediante pruebas de antagonismo.
- e) Estandarizar las condiciones particulares para los bioensayos, considerando el ciclo biológico y comportamiento de *X. affinis*.
- f) Determinar el efecto inhibitorio que tiene *T. asperellum* Th-T4 (3), en el crecimiento el hongo simbionte *Fusarium* sp., del escarabajo ambrosial *X. affinis*.

6. Materiales y Métodos

6.1 Estrategia experimental

Para la realización de este trabajo experimental, se planearon 5 etapas (Fig. 6.1.1):

- 1) Se estandarizó la técnica de obtención y mantenimiento de la colonia del escarabajo ambrosial modelo *X. affinis*.
- 2) Se implementó la técnica del cultivo y conservación del hongo entomopatógeno (HE) *M. robertsii* Xoch 8.1 y el micopatógeno *T. asperellum* Th-T4 (3).
- 3) Se evaluó el grado de tolerancia al plaguicida Malatión 1000 C.E. (AgroDelta®) para cada hongo.

- 4) Se determinó la capacidad de contención que tiene *T. asperellum* Th-T4 (3) hacia el hongo ambrosial exótico *F. euwallaceae* 744 y el hongo *Fusarium* sp. simbionte de *X. affinis*, mediante pruebas de antagonismo y técnicas de microcultivo para microscopía óptica.
- 5) Se estandarizaron las condiciones adecuadas para los bioensayos con el escarabajo ambrosial modelo *X. affinis* similar al complejo *Euwallacea* nr. *forficatus* – *Fusarium euwallaceae*.

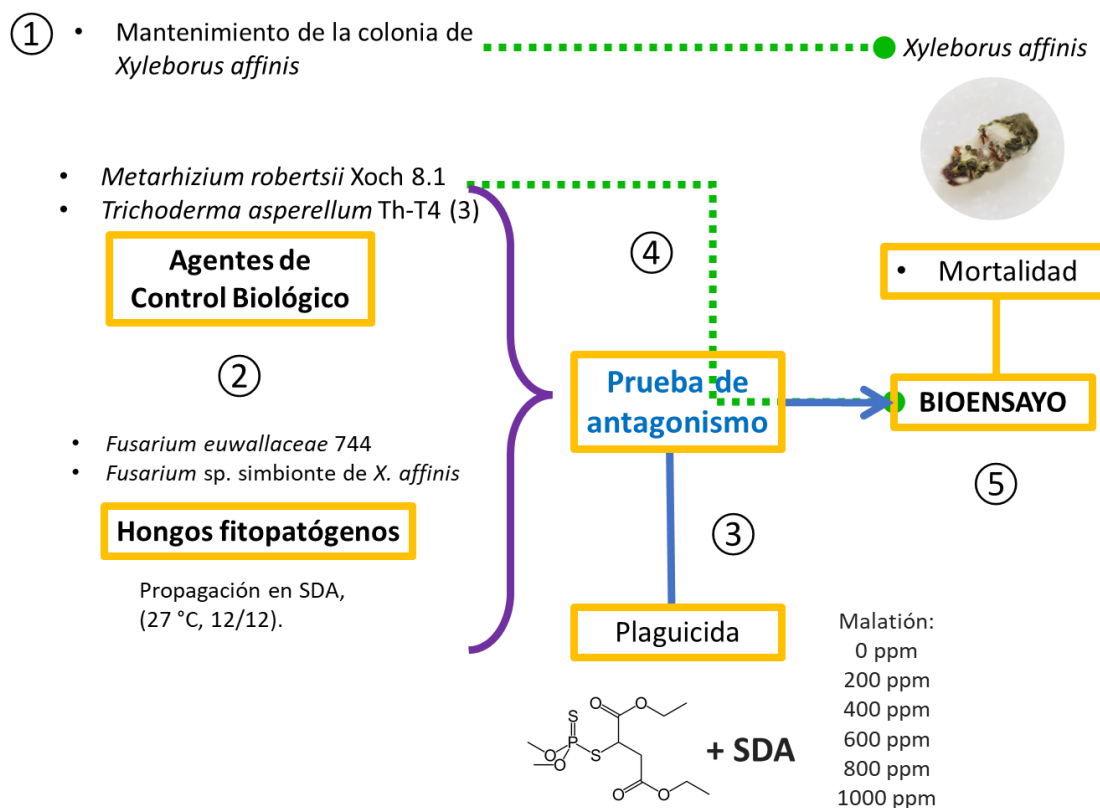


Fig. 6.1.1. Diagrama experimental. Se observa el diagrama esquemático con las 5 etapas del proceso que se llevó a cabo en la investigación.

6.2 Microorganismos

La cepa fitopatógena de *F. euwallaceae* 744, se aisló del escarabajo ambrosial *E. nr. forficatus*, colectado de *Populus* sp. L. (Malpighiales: Salicaceae), en Tijuana, Baja California, México. Tanto el

insecto como la cepa se identificaron en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), Colima, México (Montesinos-Matías, comunicación personal 2021). Se utilizó una cepa de *Fusarium* sp. simbionte de *X. affinis* que también fue aislada e identificada en el CNRCB mediante la técnica de ITS (Internal transcribed spacer) (Muñiz-Paredes, comunicación personal 2021). La cepa del hongo entomopatógeno (HE) *M. robertsii* Xoch 8.1, se encuentra depositada en la colección ENCB-IPN WDCM449 con el número de identificación ENCB-MG-81 y con el número de acceso en GenBank de OK357072. Esta cepa ha sido probada por su alta infectividad y resistencia a condiciones de campo (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017; Castillo-Minjarez *et al.*, 2019). El hongo micopatógeno *T. asperellum* Th-T4 (3), previamente identificado como *Trichoderma harzianum* Th-T4 (3) (Romero Arenas *et al.*, 2018), se identificó por la secuencia de ADN del gen de ADNr usando los cebadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990). La secuencia ITS se comparó directamente en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo *Nucleotide BLAST* (**Anexo 1**). *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) proviene de la colección de hongos del Centro de Recursos Genéticos del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México, y con el número de acceso en GenBank de OK322353. Con el fin de identificar las dificultades técnicas en los experimentos principales, incluyendo la selección de los organismos, se realizaron pruebas preliminares ocupando diferentes cepas de hongos, los cuales se encuentran en el **Anexo 2**.

6.3 Obtención y mantenimiento del escarabajo *Xyleborus affinis*

Se utilizaron escarabajos adultos hembras (fundadoras) del escarabajo ambrosial *Xyleborus affinis*. Este coleóptero fue seleccionado debido a que habita en México y su manejo y reproducción no representa un riesgo para el agroecosistema (Lira-Noriega *et al.*, 2018). Sin embargo, si los escarabajos ambrosiales nativos entraran en contacto con los exóticos, como *X. glabratus* o *E. nr. fornicatus*, podría ocurrir una transferencia lateral de los fitopatógenos simbioses (Carrillo *et al.*, 2014). Por lo tanto, el estudio de los escarabajos ambrosiales colectados en campos mexicanos podría ser útil para anticipar este hecho. Los escarabajos se colectaron de troncos de árboles de aguacate (*Persea americana* var. Hass) provenientes de Minatitlán, Colima, México específicamente de la localidad El Panteón (latitud: 19.396883 °N, longitud: -104.048417 °W). Estos troncos se cortaron con el fin de exponer a los escarabajos y posteriormente colectarlos en el laboratorio.

Una vez colectados, los escarabajos fueron identificados usando la clave taxonómica de Wood (1982), a continuación fueron desinfectados en condiciones estériles (Fig. 6.3.1). Este proceso de desinfección superficial fue mediante el siguiente tren de lavados: (1) Tween 80 al 0.05%, (2) etanol al 70%, (3) Tween 80 al 0.05% e (4) hipoclorito de sodio al 0.1%, cada lavado con una duración de 5-10 s, movilizandolos de un lugar a otro con ayuda de pincel estéril. Posteriormente los escarabajos se dejaron secar durante 20 min en papel absorbente estéril (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). Con el fin de preservar la colonia de escarabajos, estos se colocaron en tubos de vidrio de 2 cm de diámetro × 15 cm de alto, con dieta artificial rica en aserrín de aguacate, poniendo 5 escarabajos hembras por tubo con una incubación de 25 ± 2 °C, durante 4 semanas para un desarrollo adecuado de la galería (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). En el **Anexo 3** se encuentra el diagrama general de la morfología de una galería artificial de *X. affinis*.

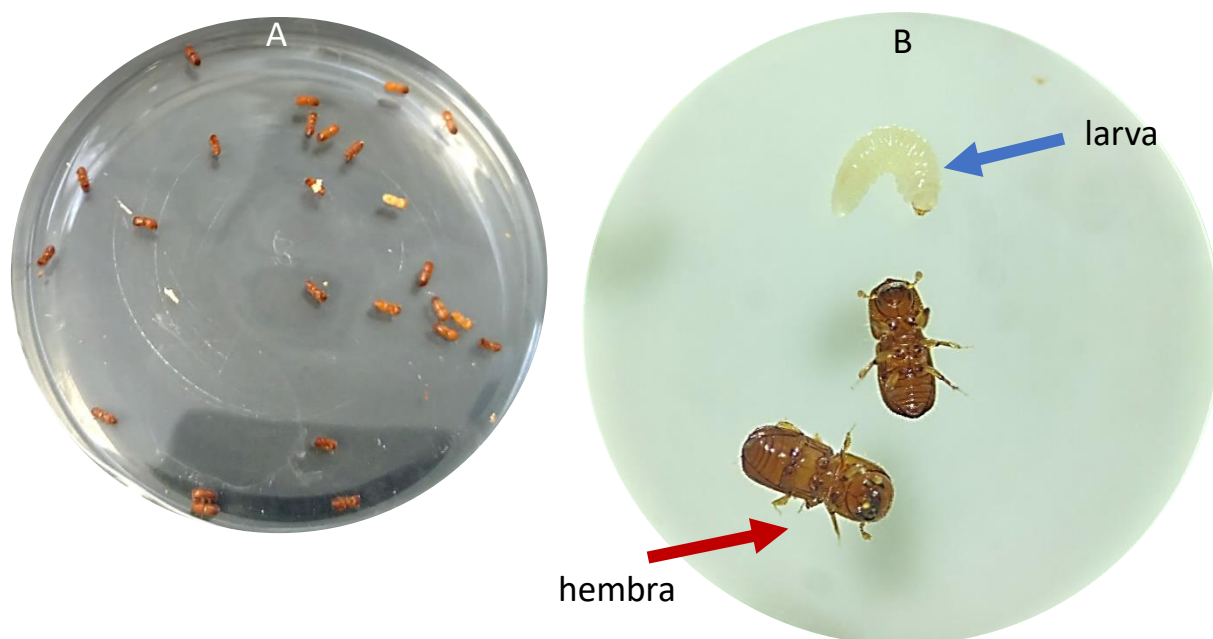


Fig. 6.3.1. A) *Xyleborus affinis* identificados mediante clave taxonómica, se observan tanto **B)** larvas (flecha azul) y escarabajos hembras (flecha roja) ya desinfectados para generar un nuevo pie de cría o su uso para bioensayo.

La dieta artificial a base de aserrín de aguacate se preparó de la siguiente manera: en un vaso de precipitado de 500 mL se colocaron los ingredientes en el siguiente orden: 300 mL de agua destilada, 0.21 g de Tetraciclina (Sigma-Aldrich®), 0.6 g de sales de Wesson (Sigma-Aldrich®), 3 g de levadura de cerveza (BD Bioxon™), 3 g de fécula de maíz (Maizena®), 3 g de peptona de caseína (BD

Bioxon™), 6 g de sacarosa (BD Bioxon™), 12 g de agar (BD Bioxon™), 1.5 mL de aceite de germen de trigo (B Nature®), 3 mL de etanol al 96% (Cooperband *et al.*, 2016). La mezcla se calentó a punto de ebullición utilizando una parrilla agitadora a 1500 rpm durante 10-15 min (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). La pasta obtenida se vació en un recipiente con 45 g de aserrín de aguacate, mezclando hasta obtener una consistencia firme (Fig. 6.3.3A) (Cooperband *et al.*, 2016). Se agregaron aproximadamente 27.5 mL de la dieta (dos terceras partes del volumen del tubo) a los tubos de vidrio (Fig. 6.3.3B), la cual se esterilizó a 121 °C, 15 psi por 15 min. Una vez estéril, se extrajeron los sobrantes de agar y se hicieron dos agujeros en el centro de la dieta de 1.6 mm diámetro y una longitud de 5-10 mm, separados entre sí por 5 mm con una aguja estéril para que los insectos pudieran colonizar con mayor facilidad la dieta (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). Este mismo proceso para la elaboración de la dieta también se ocupó para las dietas del bioensayo, exceptuando que se sustituyeron los tubos de vidrio por tubos de polipropileno de 50 mL Falcon® agregando 17.5 mL de dieta por tubo de forma que, una vez extraído el sobrante de agar, el volumen final para los bioensayos fue de 15 mL $\pm$ 1 mL (Fig. 6.3.2B).



Fig. 6.3.2. A) Se observa la pasta de consistencia firme después de haber mezclado todos los ingredientes junto con el aserrín de aguacate para la dieta de los escarabajos ambrosiales. **B)** Tubos de vidrio (flecha azul) y tubos de polipropileno (flecha roja) con pasta de aserrín de aguacate listos para su esterilización.

Para mantener homogeneizadas las colonias, se limpiaron los tubos antes y después de esterilizar la dieta para evitar el crecimiento de hongos simbioses en los restos superficiales de las

paredes del tubo. Además, en cada tubo se colocó un tapón de algodón estéril que permitiera un intercambio de aire adecuado. Para el caso de las dietas del bioensayo, la tapa cumple la función de tapón, de la misma manera debe estar firmemente sujeta, pero no apretada.

Previo al trabajo con el escarabajo ambrosial *X. affinis*, se realizaron pruebas preliminares de mortalidad con el hongo entomopatógeno *M. robertsii* Xoch 8.1 sobre el escarabajo ambrosial *Xyleborus ferrugineus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae), con el fin de comprobar la efectividad del hongo (**Anexo 4**).

6.4 Pruebas de confrontación fúngica

Los ensayos de confrontación entre *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. (versus = contra, en inglés) *Fusarium* sp. y *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *F. euwallaceae* 744, se realizaron directamente en cajas Petri con medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA por sus siglas en inglés) (BD Bioxon™), a una temperatura de 27 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Estas cepas fueron seleccionadas después haber realizado experimentos preliminares de confrontación (**Anexo 1**). Se prepararon 0.5 µL de suspensiones de conidios, de cada hongo, con una concentración de 1×10^5 con/mL con un tiempo aproximado de crecimiento entre los 8-11 días para *T. asperellum* Th-T4 (3), de 15-18 días para *F. euwallaceae* 744 y de 14-17 días para *Fusarium* sp. Para la preparación del inóculo, los conidios fueron previamente cosechados de las cajas utilizando solución de Tween 80 al 0.05% como surfactante. Se utilizó cámara de Neubauer (Marienfeld®) para contabilizar los conidios. La inoculación se realizó a una distancia de separación de 5-10 mm del borde de la caja Petri y una separación de ~ 7 cm entre cada cepa. Se inoculó primero a *F. euwallaceae* 744, y se incubó por 7 días para su crecimiento (Castrillo *et al.*, 2016), transcurrido ese tiempo se inoculó a *T. asperellum* Th-T4 (3). Como controles, cada cepa se inoculó en cajas con medio SDA por separado (sin confrontación). Las imágenes se obtuvieron con ayuda de una cámara Reflex Nikon D5200 de 21 megapíxeles. Se midió el crecimiento radial de la colonia trazando una línea de crecimiento con marcador indeleble cada 24 horas utilizando Vernier (Mituyo®) en centímetros (cm), para posteriormente calcular la velocidad de crecimiento radial (V_r).

También se realizaron pruebas cualitativas mediante la técnica de microcultivos de Quesnel (1969), utilizando el mismo tipo de confrontación descrito arriba, con ventaja de 7 días de crecimiento para *F. euwallaceae* 744 confrontándola contra *T. asperellum* Th-T4 (3) de 4-5 días. La

manera en que se preparó el microcultivo fue utilizando una concentración de conidios de 1×10^5 con/mL, como se describió antes, y en este caso, poniendo un cubreobjetos después de inocular (Fig. 6.4.1B); sin embargo, se utilizaron cubos de SDA (8 cm largo $\times$ 0.98 cm ancho $\times$ 0.5 cm espesor del medio) (Fig. 6.4.1A), con una separación entre ambas cepas de ~ 4 cm (Fig. 6.4.1C). Para observar a detalle las estructuras fúngicas y las paredes celulares, algunas muestras se tiñeron con azul de lactofenol (Leck 1999).

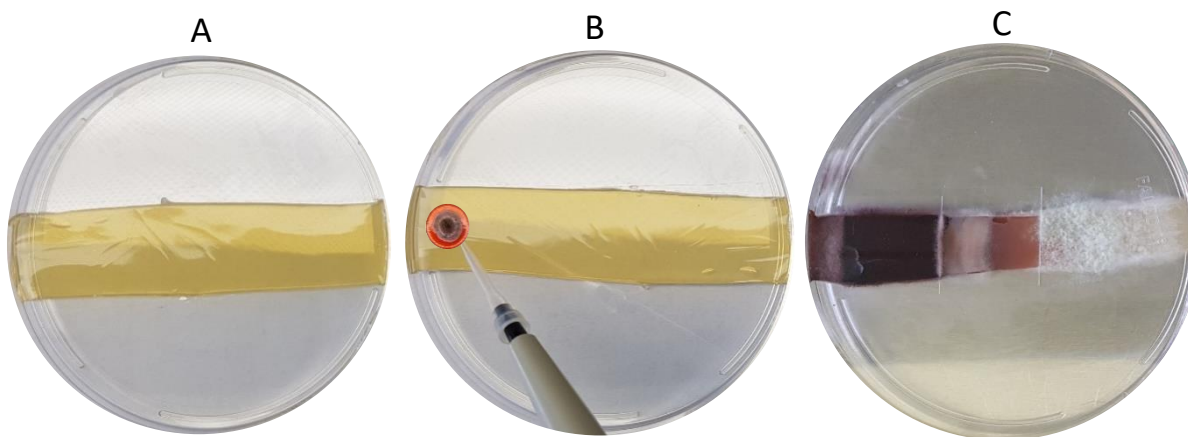


Fig. 6.4.1. Procedimiento de microcultivo para la visualización mediante microscopio **A)** Se cortaron cubos de SDA en las cajas Petri para posteriormente **B)** inocular la cepa dando ventaja a *F. euwallaceae* 744 con una **C)** separación de ~ 4 cm entre ambas cepas (de rojo *F. euwallaceae* 744 y de verde claro *T. asperellum* Th-T4 (3)).

6.5 Pruebas de Tolerancia al plaguicida Malatión

El control de los complejos ambrosiales se podría hacer con una combinación del método biológico y el químico (Jia *et al.*, 2016; Pelizza *et al.*, 2018), por lo cual, con el fin de determinar una posible compatibilidad, se estimó la tolerancia de las cepas *T. asperellum* Th-T4 (3) y *M. robertsii* Xoch 8.1 a Malatión 1000 C.E. (AgroDelta®) a concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm diluido en etanol al 96% (Mishra *et al.*, 2016). Para ello se midieron los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento radial (Vr), producción de conidios por área (Pca) y germinación de conidios (%). Se utilizó medio SDA adicionado con Malatión a la concentración deseada para cada experimento en condiciones estériles. Una vez que la mezcla se homogeneizó, se vertió en placas de Petri desechables de 90 mm, se solidificó y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para la Vr, la inoculación se realizó a una distancia entre 5 y 10 mm del borde de la placa. La concentración de

conidios fue de 1×10^5 con/mL en un volumen final de 0.5 μ L para ambas cepas. Se midió el crecimiento radial cada 24 h con Vernier para posteriormente calcular la Vr. Se realizaron análisis de regresión lineal para determinar la Vr. Para el caso de la Pca, la inoculación se realizó mediante el método de inoculación en césped con una varilla metálica estéril en toda la placa de Petri (García-Ortiz *et al.*, 2015), homogeneizando la suspensión con una concentración de 1×10^5 con/mL en un volumen final de 100 μ L para ambas cepas. La cosecha de conidios se realizó cortando un diámetro de 10 mm y homogeneizando la muestra en un tubo de propileno de 50 mL (Falcon®) añadiendo 20 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v) con agitación constante durante 2 min para cada réplica; en el día 7 para *T. asperellum* Th-T4 (3) y en el día 10 para *M. robertsii* Xoch 8.1. Los resultados se reportaron en conidios por centímetro al cuadrado (con/cm²). La germinación conidial (%) se evaluó según García-Ortiz *et al.* (2015), utilizando 100 μ L de los conidios cosechados de la prueba de Pca, por el método inoculación en césped en placas con SDA, cuantificándolas a las 14 h para *T. asperellum* Th-T4 (3) y a las 22 h para *M. robertsii* Xoch 8.1. En todas las pruebas, los conidios se cosecharon previamente con Tween 80 al 0.05% (v/v) y se cuantificaron en cámara de Neubauer.

6.6 Bioensayo con *Xyleborus affinis*

Una vez sabiendo la tolerancia que tienen los hongos al Malatión, se procedió a realizar el bioensayo utilizando el escarabajo ambrosial *X. affinis*. En primer lugar, se realizó la producción de conidios de los hongos *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3) en agar dextrosa Sabouraud contenido en cajas Petri; durante 10-14 días para *M. robertsii* Xoch 8.1 y entre 8-10 días para *T. asperellum* Th-T4 (3) a $27^\circ\text{C} \pm 2$ con un fotoperiodo de 12 h luz 12 h oscuridad. Los conidios se cosechados con Tween 80 (0.05%) se utilizaron para los bioensayos de mortalidad contra *X. affinis*. Se utilizaron escarabajos adultos hembra (fundadoras) de *X. affinis* con 15 días de desarrollo (con un grado de esclerotización similar entre sí mismas) de colonias con 4 semanas de crecimiento. Los insectos se desinfectaron superficialmente mediante tren de lavados como se menciona en la sección 6.3, y posteriormente se sumergieron durante 30 s en cada tratamiento. Inmediatamente los escarabajos se dejaron secar sobre papel absorbente estéril por 20 min (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). Se colocaron cinco fundadoras en un tubo Falcon de 50 mL con 15 mL de la dieta artificial a base de aserrín de aguacate (Fig. 6.3.3B). Se utilizaron al menos 5 tubos por tratamiento. Los tubos Falcon se incubaron durante 10 días a $25^\circ\text{C} \pm 2$. Para contabilizar la mortalidad de los escarabajos, después de 10 días de incubación, se extrajo la dieta de los tubos y se examinó cuidadosamente el

contenido en busca de insectos vivos o muertos. De acuerdo con Castrillo *et al.* (2016), este período de incubación es suficiente para permitir un establecimiento adecuado de la galería (tunelización de escarabajos y crecimiento de simbiontes). Los tratamientos que se probaron fueron: i) Conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1 (1×10^7 conidios/mL), ii) Conidios de *T. asperellum* Th-T4 (3) (1×10^6 conidios/mL), iii) Conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1 (1×10^7 conidios/mL) más conidios de *T. asperellum* Th-T4 (3) (1×10^6 conidios/mL). El testigo consistió en sumergir los insectos en Tween 80 (0.05%). También se realizaron bioensayos con Malatión 1000 C.E. (AgroDelta®) a 600 ppm (concentración de campo recomendada) y a 60 ppm (Carrillo *et al.*, 2013). La solución de Malatión para la concentración más alta (600 ppm) se preparó con 1 mL del producto comercial en 9 mL de etanol al 96%; las diluciones posteriores se realizaron utilizando Tween 80 estéril al 0.05%. Los controles se prepararon con diluciones equivalentes de 1 mL de agua destilada estéril en lugar de Malatión. Finalmente, se cuantificó la toxicidad para el escarabajo para la combinación de *M. robertsii* Xoch 8.1 más *T. asperellum* Th-T4 (3), junto con Malatión (60 o 200 ppm).

6.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo en diseños al azar. Para el caso de las pruebas de confrontación fúngica el número de repeticiones (n) fue $n \geq 3$. En los experimentos de velocidad de crecimiento radial (Vr) $n \geq 5$. Con respecto a la producción de conidios por área (Pca) $n = 5$. En las pruebas de germinación (%) $n = 4$. En los bioensayos con *X. affinis* $n \geq 5$. Los valores medios se presentan con desviación estándar. El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) se utilizó para comparar medias y las pruebas de comparación múltiple se realizaron con el análisis de Tukey. En todos los casos, el punto de consigna de significancia fue $\alpha = 0.05$. Los coeficientes de regresión lineal de los ensayos de competencia de hongos y la tasa de crecimiento radial fueron de al menos 0.94. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software *Number Cruncher Statistical System* (NCSS) (Utah, USA).

7. Resultados

7.1 Pruebas de confrontación fúngica

En los ensayos de confrontación entre *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *Fusarium* sp. y *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *F. euwallaceae* 744, se observó que *T. asperellum* Th-T4 (3) empieza a invadir el área de crecimiento de *Fusarium* sp. a partir del día 3 (Fig. 7.1.1B). Al día 7 después de inocular (ddi) *T.*

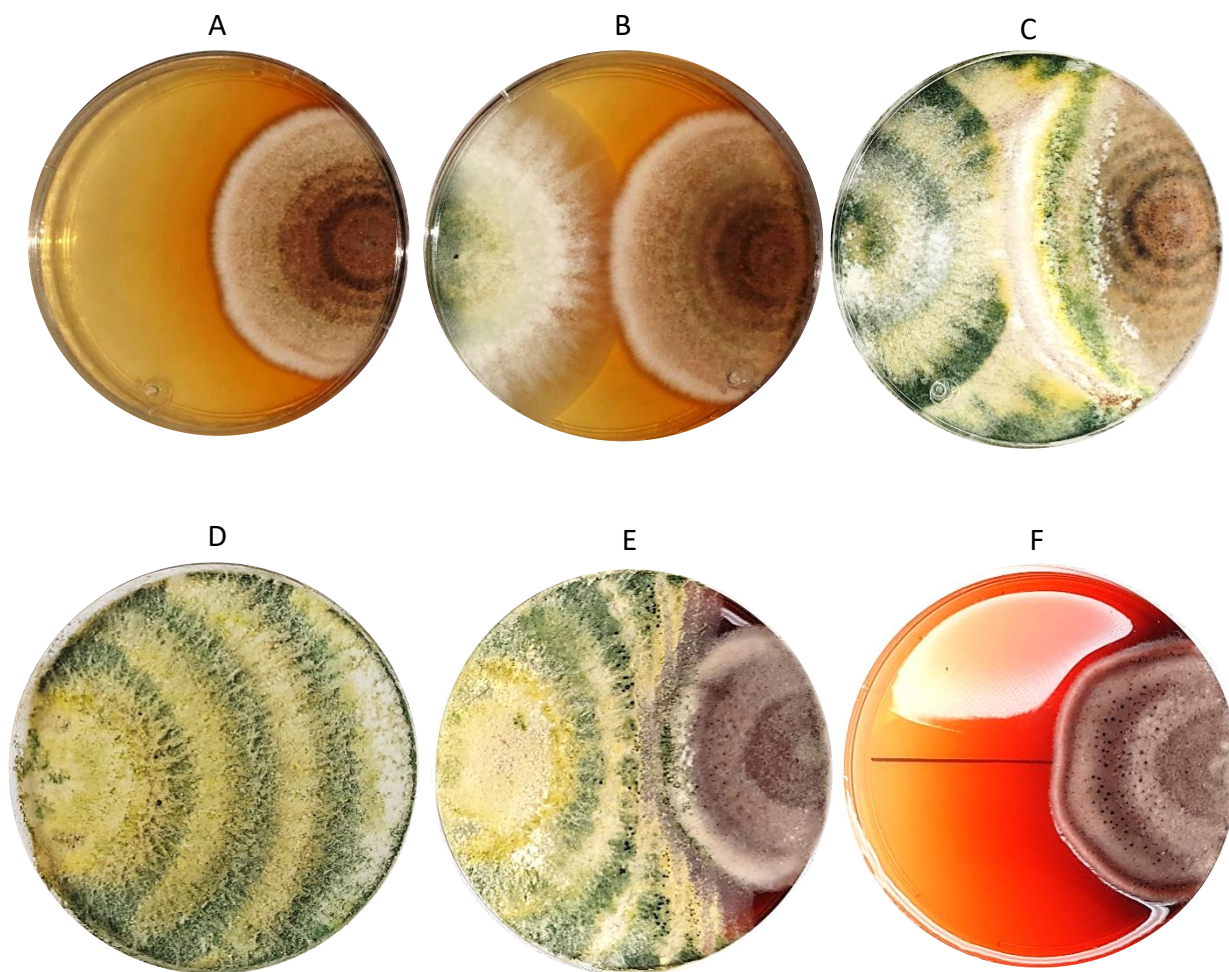


Fig. 7.1.1. Cajas Petri con medio SDA mostrando las confrontaciones de *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *Fusarium* sp. (B y C) y *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *F. euwallaceae* 744 (E) con ventaja de 7 días de crecimiento para *Fusarium* sp. y *F. euwallaceae* 744: **A)** *Fusarium* sp. al día 10 (caja control), **B)** Confrontación al día 3 ddi, **C)** confrontación al día 7 ddi, **D)** caja mostrando el crecimiento de *T. asperellum* Th-T4 (3) al cabo de 8 días, **E)** caja mostrando la confrontación de 11 días, y **F)** caja con *F. euwallaceae* 744 con 18 días de crecimiento.

asperellum Th-T4 (3) inicia la esporulación sobre el área de *Fusarium* sp., su color rojizo (Fig. 7.1.1A) se observa más descolorido cuando está invadido por *T. asperellum* Th-T4 (3) (Fig. 7.1.1C). Como puede observarse en la Fig. 7.1.1D, las placas inoculadas únicamente con *T. asperellum* Th-T4 (3) se cubrieron completamente de micelio entre los días 5 y 6 formando anillos de crecimiento radial de color verde-amarillo.

Para el caso de las placas inoculadas con *F. euwallaceae* 744 no se observó la invasión completa de la placa debido al lento crecimiento del hongo en el medio SDA, sin embargo, aún después de 18 días de incubación, el hongo continuaba creciendo y la colonia presentó un color rojo-escarlata (Fig. 7.1.1F).

Por otro lado, en las placas en donde se inocularon ambos hongos, *F. euwallaceae* 744 detuvo su crecimiento entre los días 5-6 ddi a *T. asperellum* Th-T4 (3), lo que coincidió con el hecho de que la colonia de *T. asperellum* Th-T4 (3) estuvo a punto de tocar la colonia de *F. euwallaceae* 744. Además, aproximadamente 9 días después de la introducción de *T. asperellum* Th-T4 (3), éste comenzó a esporular sobre el área de crecimiento de *F. euwallaceae* 744 (Fig. 7.1.1E). Cabe destacar que la coloración de *F. euwallaceae* 744 disminuyó cuando se hizo crecer en presencia de *T. asperellum* Th-T4 (3) (Fig. 7.1.1E).

En ausencia de confrontación, *T. asperellum* Th-T4 (3) presentó una velocidad de crecimiento radial promedio (V_r) de 1.84 cm/día, aunque al momento de ser confrontada con *Fusarium* sp. y *F. euwallaceae* 744, esta misma ventaja de 7 días de crecimiento para estos hongos simbios (abarcando casi la mitad de la caja Petri), hizo que la V_r de *T. asperellum* disminuyera significativamente a 1.39 cm/día ($p < 0.05$) (Fig. 7.1.2). Por el contrario, la V_r de *Fusarium euwallaceae* se mantuvo sin cambios tanto en ausencia como en presencia de *T. asperellum* Th-T4 (3), siendo en promedio de 0.13 cm/día (Fig. 7.1.2B). Sin embargo, el crecimiento de *Fusarium* sp., fue 2.7 veces más rápido que *F. euwallaceae* 744, además, *Fusarium* sp. se vio afectado significativamente en confrontación con *T. asperellum* Th-T4 (3), pasando de una $V_r = 0.35$ cm/día en ausencia de la confrontación a una $V_r = 0.23$ cm/día por la presencia de *T. asperellum* Th-T4 (3) disminuyendo su crecimiento un 34 % ($p < 0.05$) (Fig. 7.1.2A y B).

Para observar con mayor detalle lo ocurrido cuando ambas colonias entraron en contacto, se procedió a la realización de microcultivos. Como puede observarse en la Fig. 7.1.3A, las hifas de *T. asperellum* Th-T4 (3) presentaron una estructura lisa, en contraste con las hifas de *F. euwallaceae* 744 que presentaron una forma sinuosa y septada (Fig. 7.1.3B). Para el caso de la confrontación,

con ventaja de crecimiento a *F. euwallaceae* 744 de 7 días y una interacción de 4-5 días entre ambas cepas en medio SDA, se observó que *T. asperellum* Th-T4 (3) invade, envuelve y penetra a las hifas de *F. euwallaceae* 744 (Fig. 7.1.4A). También las hifas de *T. asperellum* Th-T4 (3) forman ganchos sobre *F. euwallaceae* 744 (Fig. 7.1.4B). Con ayuda de azul de lactofenol se observó la penetración y crecimiento de hifas de *T. asperellum* Th-T4 (3) dentro de hifas de *F. euwallaceae* 744 (Fig. 7.1.4C); así como la formación de posibles estructuras reproductoras por parte de *T. asperellum* Th-T4 (3) y la posible degradación de las hifas de *F. euwallaceae* 744 (Fig. 7.1.4D).

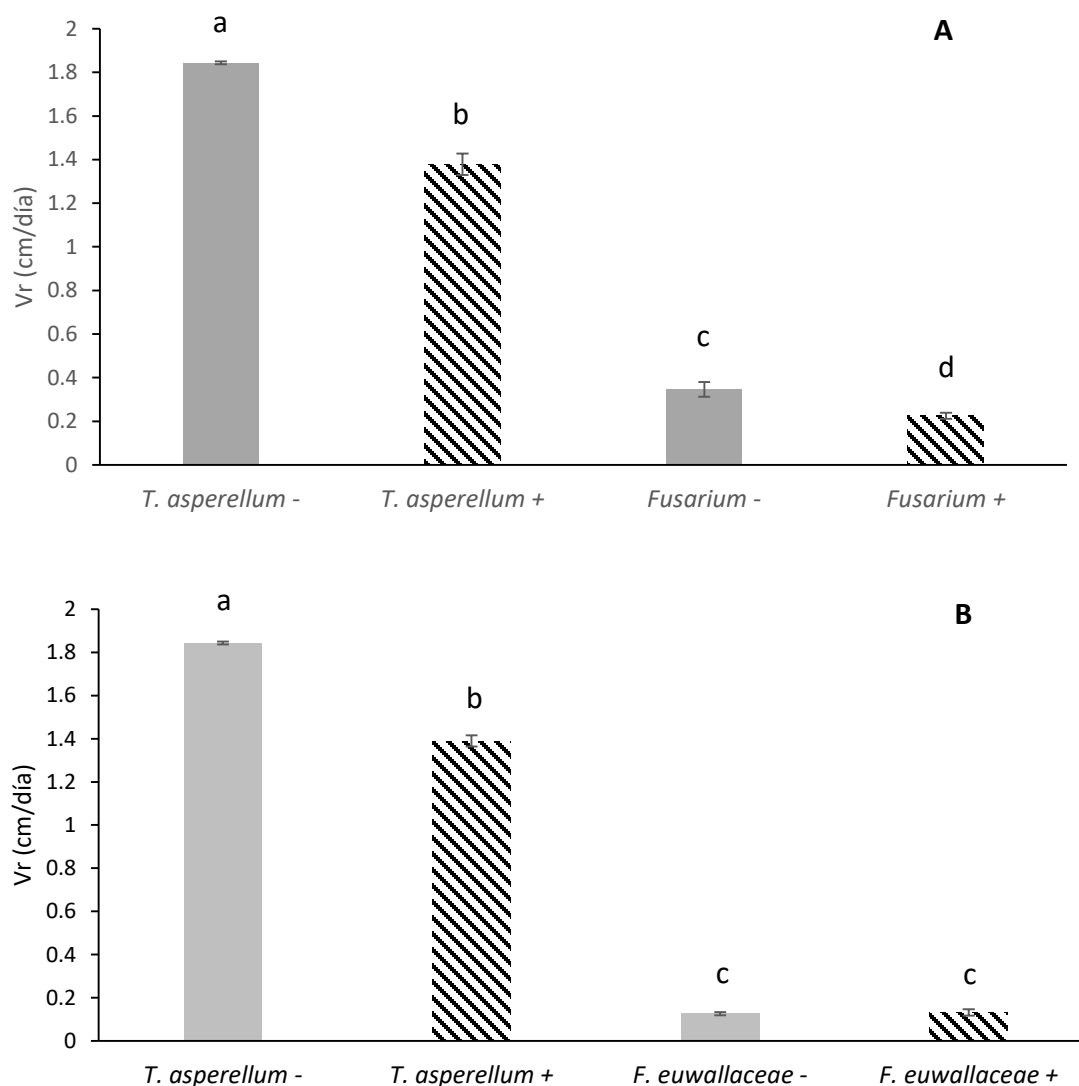


Fig. 7.1.2. Velocidades de crecimiento radial (Vr) de la confrontación **A)** *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *Fusarium* sp. y **B)** *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *F. euwallaceae* 744 con ventaja de 7 días de crecimiento para *Fusarium* sp. y *F. euwallaceae* 744 en caja de Petri con medio SDA. +/-: presencia/ausencia de confrontación. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

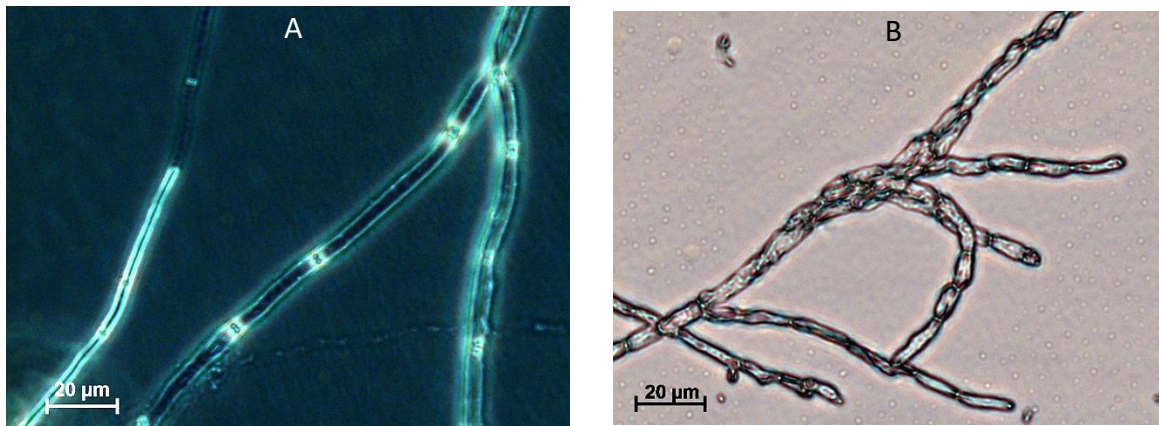


Fig. 7.1.3. Hifas de **A)** *T. asperellum* Th-T4 (3) con 4 días de crecimiento en medio SDA y **B)** las hifas de *F. euwallaceae* 744 con 7 días de crecimiento en medio SDA.

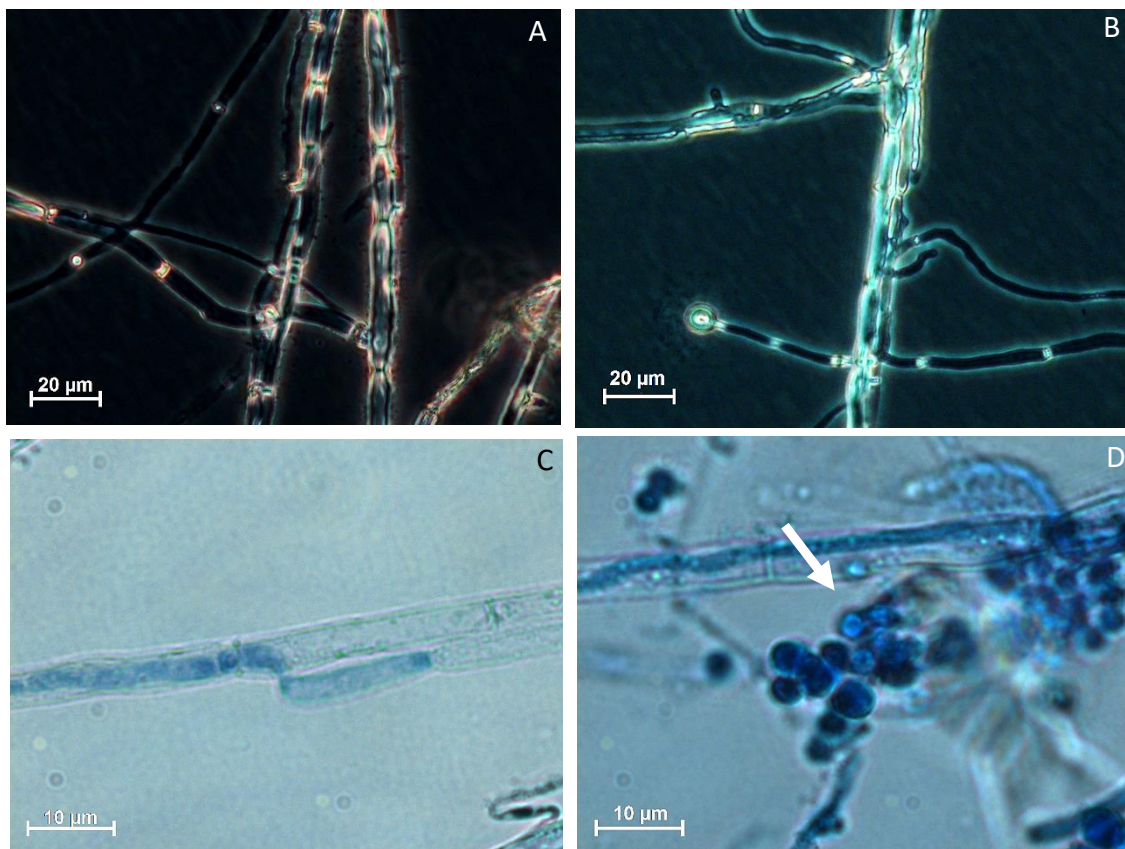


Fig. 7.1.4. Confrontación de las hifas, dándole ventaja de crecimiento a *F. euwallaceae* 744 de 7 días y con una confrontación de 4-5 días en medio SDA. **A)** Se observó la invasión por parte de *T. asperellum* Th-T4 (3) penetrando y envolviendo las hifas de *F. euwallaceae* 744. **B)** También se pudo observar a hifas de *T. asperellum* Th-T4 (3) formando ganchos en *F. euwallaceae* 744. **C)** Se observó la penetración de *T. asperellum* Th-T4 (3) hacia *F. euwallaceae* 744. **D)** También se observó la formación de posibles estructuras reproductoras de *T. asperellum* Th-T4 (3) y la posible degradación de las hifas de *F. euwallaceae* 744 (flecha blanca).

7.2 Pruebas de Tolerancia al plaguicida Malatión

Con la finalidad de evaluar la compatibilidad entre los agentes de control microbiano *T. asperellum* Th-T4 (3) y *M. robertsii* Xoch 8.1, se evaluó la velocidad de crecimiento radial (Vr) de cada hongo en presencia de diferentes concentraciones de Malatión. De manera general, la Vr de ambas cepas disminuyó conforme aumentó la concentración del plaguicida químico (Tabla 7.2.1). También la velocidad de crecimiento de *T. asperellum* Th-T4 (3) (1.74 cm/día) fue 6.4 veces mayor que la de *M. robertsii* Xoch 8.1 (0.27 cm/día), en ausencia de Malatión. Al realizar la exposición al Malatión, el crecimiento de ambas cepas se afectó negativamente, incluso a la menor concentración evaluada (200 ppm); en este caso la velocidad de crecimiento promedio fue de 1.29 y 0.18 cm/día, para *T. asperellum* Th-T4 (3) y *M. robertsii* Xoch 8.1, respectivamente, lo que significó un decremento de 1.35 y 1.5 veces en comparación con el respectivo control en ausencia de plaguicida químico. De la misma manera, para el caso de la exposición a 400 ppm del compuesto, se observó una reducción estadísticamente significativa en la velocidad de crecimiento, siendo de 0.81 cm/día para *T. asperellum* Th-T4 (3), 1.59 veces menor en comparación con el crecimiento observado en presencia de 200 ppm de Malatión; y de 0.14 cm/día para *M. robertsii* Xoch 8.1, 1.29 veces menos en comparación con 200 ppm.

Tabla 7.2.1. Velocidad de crecimiento radial (cm/día) y su porcentaje de reducción de las cepas *T. asperellum* Th-T4 (3) y *M. robertsii* Xoch 8.1 a concentraciones de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm de Malatión.

Malatión (ppm)	<i>T. asperellum</i> Th-T4 (3) (cm/día)	Reducción (%)	<i>M. robertsii</i> Xoch 8.1 (cm/día)	Reducción (%)
0	1.74 ^a	0 ^a	0.27 ^a	0 ^a
200	1.29 ^b	25.86 ^b	0.18 ^b	33.33 ^b
400	0.81 ^c	53.45 ^c	0.14 ^c	48.15 ^c
600	0.81 ^c	53.45 ^c	0.13 ^{cd}	51.85 ^{cd}
800	0.76 ^{cd}	56.32 ^{cd}	0.12 ^{de}	55.56 ^{de}
1000	0.68 ^d	60.92 ^d	0.10 ^e	62.96 ^e

Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En general, la exposición de ambos hongos a concentraciones del plaguicida químico entre 400 y 800 ppm causó un efecto similar, es decir, a estas concentraciones la velocidad de crecimiento se redujo alrededor del 50% en los dos hongos en relación a su crecimiento sin Malatión (Tabla 7.2.1). Finalmente, a la máxima concentración evaluada (1000 ppm) la velocidad de crecimiento se redujo en un 61 % para *T. asperellum* Th-T4 (3) y en un 63% para *M. robertsii* Xoch 8.1, siendo de 0.68 y 0.10 cm/día, respectivamente.

Además de la velocidad de crecimiento, otros parámetros fisiológicos que se afectan por la presencia de compuestos inhibitorios o tóxicos son la producción de conidios y su germinación (Castillo-Minarez *et al.*, 2019). Por lo tanto, en un siguiente experimento se procedió a evaluar dichos indicadores de crecimiento en los cultivos de *T. asperellum* Th-T4 (3) y *M. robertsii* Xoch 8.1 expuestos a diferentes concentraciones de Malatión.

La producción de conidios por área (Pca) en ausencia de Malatión fue de 8.12×10^7 y 1.6×10^8 con/cm², para *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), respectivamente (Fig. 7.2.1). Sorpresivamente, en ambas cepas la producción de conidios aumentó significativamente ($p < 0.05$),

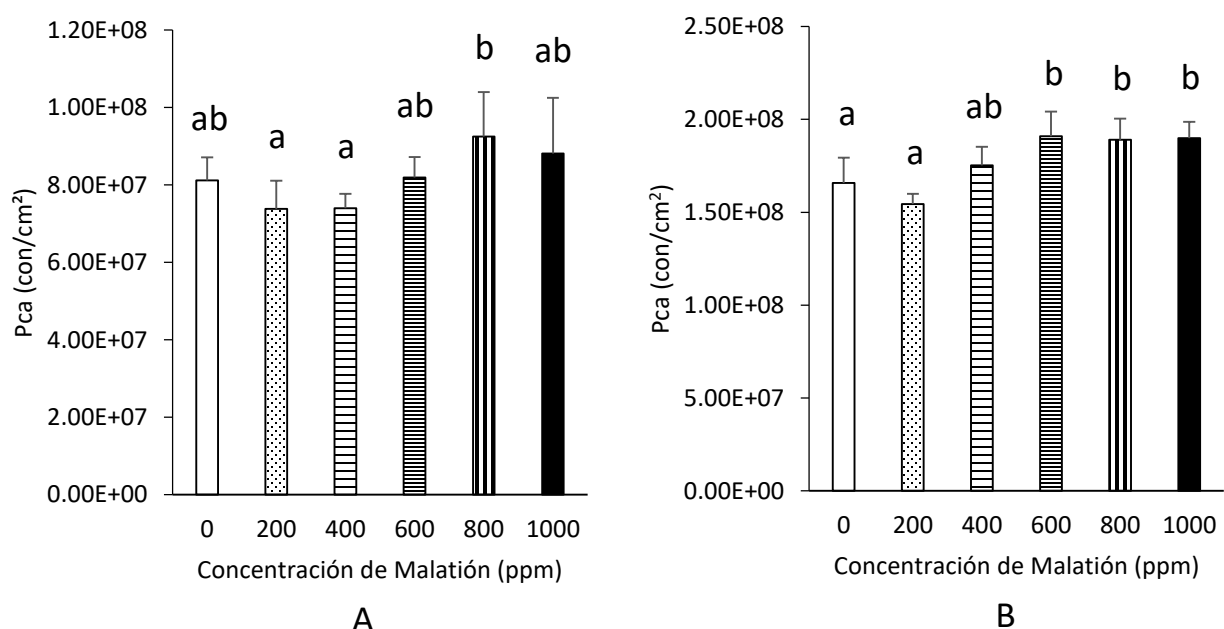


Fig. 7.2.1. Producción de conidios por área (Pca) donde **A)** Pca de *M. robertsii* Xoch 8.1, y **B)** Pca de *T. asperellum* Th-T4 (3). Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

al exponer a los hongos a concentraciones de Malatión por arriba de 600 ppm. Como puede observarse en la Figura 7.2.1A, el aumento en la dosis de Malatión de 200 a 800 ppm incrementó un 25% la producción de conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1, mientras que la producción de conidios de *T. asperellum* Th-T4 (3) para el caso de 1000 ppm de Malatión presentó diferencias estadísticas significativas con un 14.5% mayor que en ausencia del insecticida ($p < 0.05$) (Fig. 7.2.1B).

Con respecto a la germinación (%), los conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1 mostraron tolerancia a Malatión desde 0 ppm hasta 600 ppm, presentando una germinación cercana al 85%; sin embargo, a 800 y 1000 ppm se observó un decremento estadísticamente significativo en la germinación siendo de 75.2 y 76.6%, respectivamente ($p < 0.05$) (Fig. 7.2.2A). La germinación para el caso de *T. asperellum* Th-T4 (3) no presentó diferencias estadísticas significativas en los tratamientos, ya que incluso a la máxima concentración de Malatión evaluada (1000 ppm) se observó un porcentaje de germinación superior al 99% (Fig. 7.2.2B).

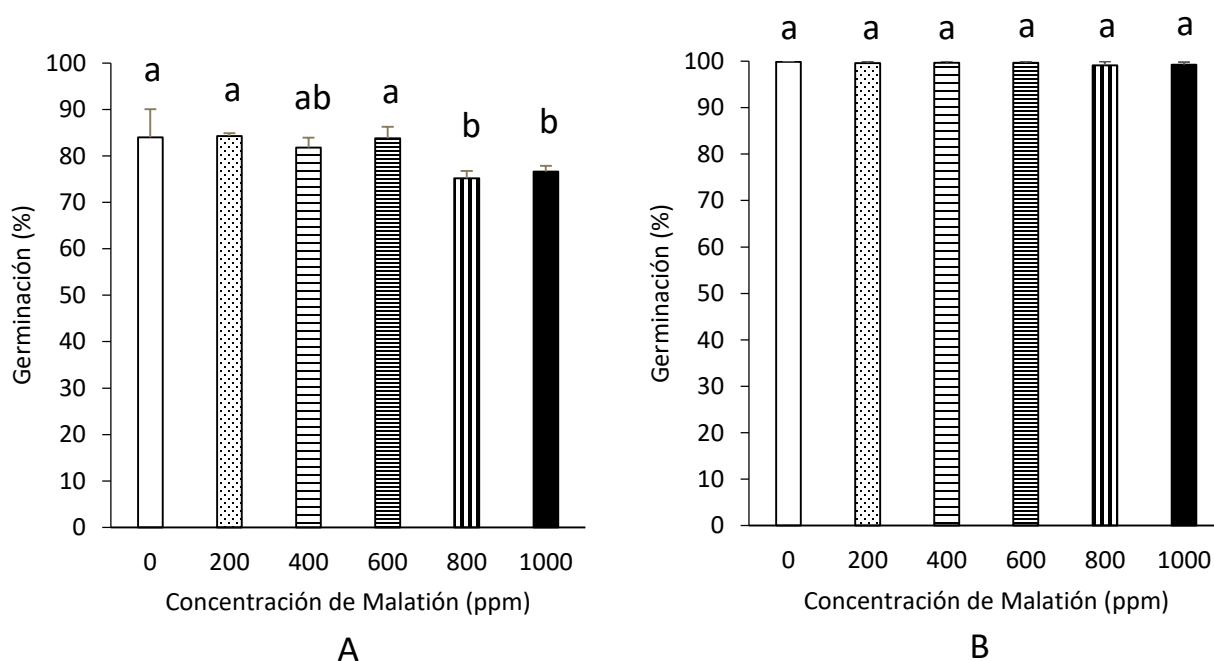


Fig. 7.2.2. Porcentaje de germinación de **A)** *M. robertsii* Xoch 8.1, y **B)** *T. asperellum* Th-T4 (3). Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.3. Bioensayos con *Xyleborus affinis*

En los bioensayos con galerías artificiales usando *X. affinis*, se logró observar la infección por parte del hongo entomopatógeno *M. robertsii* Xoch 8.1 (Fig. 7.3.1), a los 10 días de interacción. No se observó crecimiento o invasión de otro microorganismo sobre *X. affinis* en los demás tratamientos. La inoculación con *M. robertsii* Xoch 8.1 alcanzó una mortalidad del 76%; la combinación de *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3) logró el 76.7% de mortalidad. Sin embargo, la mezcla de ambos hongos, *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), a concentraciones más bajas de Malatión 60 y 200 ppm, la mortalidad registrada fue de 80% y 88%,



Fig. 7.3.1. *Xyleborus affinis* micosado con la cepa *M. robertsii* Xoch 8.1 con 10 días de interacción.

respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticas significativas. Para los tratamientos de control con Tween 80 al 0.05% (Tween Control), Tween 80 al 0.05% con agua destilada estéril más etanol al 96% en lugar de Malatión (Tween Control + Etanol), y *T. asperellum* Th-T4 (3), no se observaron diferencias estadísticas significativas en la mortalidad (Tabla 7.3.1). Concentraciones de Malatión entre 60 y 600 ppm fueron significativamente diferentes con una mortalidad promedio de 68% y 96% respectivamente ($p < 0.05$) (Tabla 7.3.1). La mortalidad de *X. affinis* generada por el hongo entomopatógeno *M. robertsii* Xoch 8.1 fue tan alta como la provocada con Malatión a 600 ppm (Tabla 7.3.1), sin diferencias estadísticas significativas. Finalmente, se realizó una comparación entre

los resultados obtenidos con el hongo entomopatógeno *M. robertsii* Xoch 8.1 y con el Malatión a 600 ppm. Al respecto se encontró que no existen diferencias estadísticas significativas entre aplicar cualquiera de los dos tratamientos (Tabla 7.3.1).

8. Discusión

El control biológico de complejos ambrosiales presenta diversos retos, entre las cuales destacan que estos insectos se adaptan rápidamente a diferentes entornos (Hulcr y Stelinski 2017), atacan muchas especies de la familia Lauraceae (Eskalen *et al.*, 2013), y además, los plaguicidas químicos no siempre

Tabla 7.3.1. Mortalidad (%) de hembras de *X. affinis* 10 días post tratamiento.

Tratamiento	n	Mortalidad (%)	± SE
Control Tween	7	17.1 ^a	5.22
Control Tween + Etanol	5	16.0 ^a	7.48
<i>Ta</i>	5	32.0 ^a	4.90
Malatión (60 ppm)	5	68.0 ^b	4.90
Malatión (60 ppm) + <i>Mr</i> + <i>Ta</i>	5	80.0 ^{bc}	6.32
<i>Mr</i>	5	76.0 ^{bc}	7.48
<i>Mr</i> + <i>Ta</i>	6	76.7 ^{bc}	6.15
Malatión (200 ppm) + <i>Mr</i> + <i>Ta</i>	5	88.0 ^{bc}	4.90
Malatión (600 ppm)	5	96.0 ^c	4.00

Las medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). **Ta**: *T. asperellum* Th-T4 (3), **Mr**: *M. robertsii* Xoch 8.1, **SE**: Error Estándar, **n**: Número de tubos por tratamiento.

son la alternativa de control más adecuada (Carrillo *et al.*, 2013). Lo anterior es crítico debido a que los escarabajos se encuentran ocultos dentro de los árboles, dificultando la aspersión de los

químicos para lograr el contacto o porque los sistemas de producción de cultivos orgánicos no pueden emplear plaguicidas (Aktar *et al.*, 2009; FAO, 2020). Con respecto a los hospedadores potenciales, aproximadamente 207 especies de árboles, incluido el aguacate (*Persea americana* Mill.; Lauraceae), han mostrado signos y síntomas consistentes con el ataque de *Euwallacea* nr. *forficatus* y parte de estos con *Fusarium* sp. (Eskalen *et al.*, 2013).

En México, existe un peligro latente de que este escarabajo ataque hasta 120 especies de Lauráceas (90% de la diversidad de Lauraceae en el país) (Lira-Noriega *et al.*, 2018). Uno de los escenarios más peligrosos que se podría presentar es el posible intercambio de los hongos patógenos exóticos con escarabajos ambrosiales nativos vía transferencia lateral (Carrillo *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2019), siendo *X. affinis* una especie originaria de México, reportada como potencialmente peligrosa generando pérdidas en los cultivos incluyendo el aguacate (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020; Ángel-Restrepo *et al.*, 2021), un posible hospedero de estos hongos patógenos como *F. euwallaceae*.

En relación a los ensayos de confrontación, el hongo micopatógeno *T. asperellum* Th-T4 (3) limitó el crecimiento del fitopatógeno *F. euwallaceae* 744. Es importante resaltar que *F. euwallaceae* 744 no es un simbiote de *X. affinis*, sin embargo, se ha reportado la asociación entre *X. affinis* y otras especies de *Fusarium* y *Raffaelea* (Ibarra-Juarez *et al.*, 2020). Por lo tanto, es probable que a futuro se de alguna asociación con especies patógenas de estos hongos. Por otro lado, desde una perspectiva práctica, el estudio de la efectividad de *T. asperellum* Th-T4 (3) para inhibir el crecimiento de *F. euwallaceae* 744 fue una prioridad, sin embargo, los experimentos de confrontación con la especie de *Fusarium* sp. simbiote de *X. affinis* muestran que *T. asperellum* Th-T4 (3) tiene la capacidad de contener al hongo.

Para controlar el complejo escarabajo/hongo simbiote, en el presente estudio se mostró la efectividad de *T. asperellum* Th-T4 (3) en confrontación con *F. euwallaceae* 744. *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) logró detener el crecimiento e invadir al hongo ambrosial, posiblemente por la acción micopatógena del mismo, mediada por liberación de quitinasas, β -1,3-glucanasas (Giese *et al.*, 2011; Noronha y Ulhoa, 2000) y proteasas, en acción sinérgica con las trichorzianinas (peptaiboles antibióticos) (Marik *et al.*, 2018, Schirmböck *et al.*, 1994).

Las imágenes de la confrontación, entre las cepas de *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *Fusarium* sp. y *T. asperellum* Th-T4 (3) Vs. *F. euwallaceae* 744 muestran el mecanismo de parasitismo que ejerce *T. asperellum* Th-T4 (3) sobre estas cepas simbiotes, además de disminuir significativamente la

velocidad de crecimiento radial (V_r) de *Fusarium* sp. un 34% ($p < 0.05$). Según Sánchez-Rangel *et al.* (2018), existen transcripciones relacionadas con la señalización del pH, como la vía PAL/RIM conservada, relacionada con el metabolismo secundario y otras transcripciones diferenciales, además de mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia en *Fusarium* sp. asociado con *Euwallacea* nr. *forficatus*, lo que podría explicar la presente variación en el desarrollo entre distintas especies de *Fusarium*, como se observó con *Fusarium* sp. que tuvo una velocidad de crecimiento más rápida que *F. euwallaceae* 744 y se vio significativamente afectada por *T. asperellum* Th-T4 (3). Cabe señalar que *Fusarium* sp., simbionte de *X. affinis*, no es la fuente primaria de alimentación como sí lo es *Raffaelea axii* (Ophiostomatales: Ophiostomataceae), no obstante, se ha reportado que *Fusarium* sp. funciona como un posible mecanismo de invasión hacia el tejido vegetal degradando las paredes celulares (Biedermann, 2020; Ibarra-Juarez *et al.*, 2020) (Fig. 7.1.4.B). *Trichoderma* spp. (*T. asperellum* incluido) crece enrollando a las hifas del fitopatógeno formando estructuras en forma de gancho (presumiblemente apresorios) que ayudan a penetrar la pared celular del huésped (Elad *et al.*, 1983), como sucede con algunas cepas fitopatógenas del género *Fusarium* (Viterbo y Horwitz, 2010; El_Komy *et al.*, 2015). Por lo tanto, al reducir la fuente de alimentación primaria (hongos ambrosiales) dentro de las galerías de los árboles infectados, se podría disminuir la población de escarabajos ambrosiales y su descendencia (Biedermann *et al.*, 2011; Hulcr y Stelinski, 2017).

En el caso de las pruebas de tolerancia al Malatión, se observó una disminución en la velocidad de crecimiento radial (V_r) para ambas cepas conforme aumenta la concentración del plaguicida químico. Mishra *et al.* (2016), reportaron datos similares con *T. harzianum* T103 con respecto al crecimiento radial, en donde encontraron diferencias en el crecimiento a partir del tratamiento con 200 ppm de Malatión. En los resultados, sobresale que *T. asperellum* Th-T4 (3) aumentó su producción de conidios por área (Pca), además de un porcentaje de germinación del 99% en todos los tratamientos (Fig. 7.2.1B y Fig. 7.2.2B). Esto debido a que *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de tolerar y degradar compuestos químicos (incluyendo plaguicidas organofosforados como el Malatión), gracias a su maquinaria enzimática de proteasas, esterases y otras enzimas (Katayama y Matsumura, 1993; Sidhu *et al.*, 2019), incluyendo el gen *zfc1* “zinc finger chimera 1”, junto con oxidorreductasas y transportadores ABC con la función de tolerar el estrés causado por el plaguicida químico Diclorvos a *T. asperellum* TJ01 (Wu *et al.*, 2018). Además, existen cepas de *Trichoderma viride* descomponen Malatión a través de la acción de la carboxilesterasa (Matsumura y Boush, 1966), por un proceso de desmetilación (Mostafa *et al.*, 1972), o por otras posibles vías de

degradación (Paris *et al.*, 1975; Goda *et al.*, 2010). Esto podría generar la posibilidad de que el Malatión promueva la conidiación en los hongos (Staley *et al.*, 2015), aumentando su producción como se muestra en los resultados de la Fig. 7.2.1.

La capacidad de los hongos para responder al estrés depende del nivel de estresor y del momento en el desarrollo del cultivo cuando éste se aplica, cada factor puede disminuir o mejorar la esporulación (Miranda-Hernández *et al.*, 2016; Castillo-Minjarez *et al.*, 2019). Como se muestran en las Fig. 7.2.1 y Fig. 7.2.2, la cepa de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 presentó una mayor sensibilidad en presencia de Malatión en los parámetros Pca y germinación (%) que *T. asperellum* Th-T4 (3). Se sabe que *Metarhizium* spp., posee una menor tolerancia a los plaguicidas que *Trichoderma* spp. (Sidhu *et al.*, 2019), sin embargo, se ha reportado que *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae), posee un cierto grado de tolerancia a insecticidas como Abamectin e Imidacloprid (Niassy *et al.*, 2012). Al usar simultáneamente *M. anisopliae* y Malatión a dosis de 1000, 100 y 10 ppm, Mohamed *et al.* (1987), reportaron un porcentaje de germinación del 67.8%, 87.5% y 93.2%, respectivamente. Esto concuerda con los valores obtenidos con *M. robertsii* Xoch 8.1 en concentraciones de 1000 y 200 ppm en el presente estudio, mostrando una germinación promedio de 76.6% y 84.3%, respectivamente.

Los bioensayos con *M. robertsii* Xoch 8.1 causaron la misma mortalidad (76%) en *Xyleborus affinis*: *M. robertsii* Xoch 8.1 (1×10^7 con/mL) solo, o *M. robertsii* Xoch 8.1 (1×10^7 con/mL) en combinación con *T. asperellum* Th-T4 (3) (1×10^6 con/mL) (Tabla 7.3.1), incluso cuando la confrontación en placas de Petri entre estos dos hongos mostró que *T. asperellum* Th-T4 (3) inhibe en cierta medida el crecimiento de *M. robertsii* Xoch 8.1 (**Anexo 2**). Castrillo *et al.* (2016), reportaron una mortalidad similar con los escarabajos ambrosiales *Xylosandrus crassiusculus* y *Xylosandrus germanus*. En ese trabajo, los autores aplicaron *Metarhizium brunneum* F52 y *T. harzianum* T22 a una concentración de 1×10^6 con/mL y 3.7×10^5 con/mL, generando una mortalidad en los escarabajos del 50.7% y 5.1%, respectivamente. En el presente trabajo, *M. robertsii* Xoch 8.1 logró una mortalidad 1.5 veces mayor en *X. affinis*. Esto podría deberse a una mayor dosis de conidios o al uso de dietas artificiales en lugar de troncos. De igual manera, Carrillo *et al.* (2013), obtuvieron una mortalidad entre el 80% y 100% del escarabajo ambrosial *Xyleborus glabratus* en troncos de aguacate utilizando concentraciones de Malatión entre 100-500 ppm, respectivamente. En el presente trabajo, el Malatión a 60 y 600 ppm causó una mortalidad en *X. affinis* del 68% y 96%, respectivamente; la variación posiblemente se debió al uso de la dieta artificial. Los resultados

mostraron que un tratamiento combinado con hongos (*M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3)) y dos concentraciones de Malatión más bajas de lo recomendado (60-200 ppm), lograron una mortalidad similar a la de Malatión a 600 ppm. Se observó que *M. robertsii* Xoch 8.1 fue tan efectivo como el tratamiento más agresivo con el plaguicida químico; sin embargo, para aquellos casos en los que las plagas son muy resistentes, el fortalecimiento de concentraciones más bajas de plaguicidas en combinación con hongos entomopatógenos podría ser conveniente. Esto podría ser un factor crítico ya que la resistencia de los insectos a los plaguicidas químicos es variable (Dang *et al.*, 2017), y el efecto sinérgico entre los agentes químicos y biológicos puede ser una opción adecuada (Abd El-Ghany y Masmali, 2016; Pelizza *et al.*, 2018). Un punto importante a explorar es la estrategia que se llevaría a cabo para su aplicación en campo, una opción es aplicar por separado en distintos días cada hongo y después el plaguicida químico, invertir el orden de los hongos e incluso, aplicar alguno de los hongos al mismo tiempo que el plaguicida, todo esto dependiendo del insecto al cual se quiera controlar e incluso la relación costo/beneficio que esto conlleve. Gugliuzzo *et al.* (2021), ha reportado que existe una amplia variación en la eficacia de los plaguicidas químicos indicando que posiblemente algunos plaguicidas no son tan efectivos para el control de los escarabajos ambrosiales invasivos del género *Xylosandrus*, esto genera la posibilidad de potenciar algunos de los plaguicidas químicos utilizados en campo disminuyendo su uso al combinarlo con alguno de los hongos probados.

Otro factor importante a considerar, es la persistencia de los plaguicidas en el medio ambiente, causando alteraciones en los ecosistemas (Mulla *et al.*, 1981), y daño a la salud humana, esto incluye al Malatión y otros plaguicidas (Baker *et al.*, 1978; Singh *et al.*, 2013). *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Acinetobacter johnsonii* y *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de degradar el Malatión (Singh *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2019). Por lo tanto, la combinación de ambos hongos como se describe en el presente estudio, podría resultar benéfica, ya que existen cepas de *M. anisoplie* y de *T. harzianum* que pueden tolerar e incluso degradar el Malatión (Abd El-Ghany y Masmali 2016). En este sentido, la compatibilidad y sinergismo de *M. robertsii* y *M. anisoplie* con los insecticidas químicos (Jia *et al.*, 2016; Pelizza *et al.*, 2018), puede ser una alternativa viable para controlar insectos plaga, y al mismo tiempo minimizar los efectos químicos adversos al ambiente. Este puede ser un punto clave para el uso combinado en áreas donde el Malatión persiste, o donde el uso tiene que ser reducido e incluso degradado por hongos micopatógenos y entomopatógenos. Otra ventaja de *M. robertsii* y *Trichoderma* spp. es que estos hongos actúan como endófitos en las plantas brindando protección contra insectos plaga, estrés ambiental, enfermedades (Sasan y Bidochka,

2012; Carro-Huerga *et al.*, 2020), incluyendo a virus como el del mosaico del pepino (Rahimi-Tamandegani *et al.*, 2021). En particular, este trabajo muestra por primera vez una compatibilidad entre hongos micopatógenos y entomopatógenos con un plaguicida químico (Malatión) para el control del complejo ambrosial.

9. Conclusión

Los resultados muestran la capacidad de *M. robertsii* Xoch 8.1 para controlar el escarabajo ambrosial *Xyleborus affinis* en la misma medida que Malatión a las dosis recomendadas. La tolerancia a este plaguicida por *M. robertsii* Xoch 8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3) sugiere la posibilidad de utilizar un tratamiento mixto para el complejo ambrosial, incluso a una concentración de Malatión inferior a la recomendada (60 y 200 ppm); esto podría reducir el impacto negativo que el Malatión genera en el ambiente. Además, se mostró la capacidad de la cepa *T. asperellum* Th-T4 (3) para inhibir el crecimiento del hongo ambrosial patógeno *F. euwallaceae* y del simbiote *Fusarium* sp. aislado de *X. affinis*. La tolerancia al Malatión podría ser beneficiosa cuando es deseable un efecto sinérgico para controlar escarabajos que tienen mayor resistencia o en campos donde el plaguicida químico persiste y se acumula.

10. Perspectivas

A corto plazo: A) se tiene planeado realizar una observación con ayuda de Microscopía de Barrido de las cepas simbiotes de *Xyleborus affinis* incluyendo a *Raffaelea arxii*, la cual se ha reportado como una de las principales especies simbiotes de este escarabajo. Además, la confrontación de este simbiote con *T. asperellum* Th-T4 (3) con el fin de observar el comportamiento más a detalle de esta interacción. B) La realización más detallada de confrontaciones triples entre los microorganismos (**Anexo 5**).

A mediano plazo: A) Identificar genéticamente las cepas simbiotes de *X. affinis* teniendo en cuenta los métodos para el aislamiento de los simbiotes (esto debido a que los escarabajos ambrosiales poseen más de un hongo simbiote).

A largo plazo: A) Llevar a cabo evaluaciones en campo, en zonas donde predomine la aplicación de los plaguicidas químicos con la posibilidad de disminuir su uso mediante la técnica de control mixta

(ya sea con los hongos o con un agente biológico y un químico, pero con menor dosis de este último), principalmente en lugares afectados por los escarabajos ambrosiales.

Referencias

- Abd El-Ghany TM, Masmali IA (2016). Fungal biodegradation of organophosphorus insecticides and their Impact on soil microbial population. *J Plant Pathol Microbiol*, 7(5): 349. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000349>
- Ángel-Restrepo M, Ochoa-Ascencio S, Fernandez-Pavía S, Vázquez-Marrufo G, Equihua-Martínez A, Barrientos-Priego A, Correa-Suarez M, Saucedo-Carabez JR (2019). Identification of ambrosial beetles (Coleoptera: Curculionidae) associated with avocado trees in Michoacan, Mexico. *Folia Entomológica Mexicana*, 5(2): 79–88. https://www.researchgate.net/publication/336651361_Identificacion_de_escarabajos_ambrosiales_Coleopteros_Curculionidae_asociados_a_arboles_de_aguacate_en_Michoacan_Mexico_Folia_Entomologica_Mexicana
- Ángel-Restrepo M, Parra PP, Ochoa-Ascencio S, Fernández-Pavía S, Vázquez-Marrufo G, Equihua-Martínez A, Barrientos-Priego AF, Ploetz RC, Konkol JL, Saucedo-Carabez JR, Gazis R (2021). First look into the ambrosia beetle-fungus symbiosis present in commercial avocado orchards in Michoacán, Mexico. *Environ Entomol*, 22: nvab142. <https://doi.org/10.1093/ee/nvab142>
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O (2003). Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of Malathion in blood and liver of rats. *Human & Experimental Toxicol*, 22(4): 205–211. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht346oa>
- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*, 2(1): 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Asociación Agrícola Local de Productores de Aguacate en Uruapan Michoacán México (APROAM) (2021). Precios del aguacate Hass en huerta por kilogramo de fruta semana del 9 al 16 de noviembre de 2021. Último acceso: 23 de noviembre 2021. <https://aproam.com/Precios>
- Baker EL, Warren M, Zack M, Dobbin RD, Miles JW, Miller S, Alderman L, Teeters WR (1978). Epidemic Malathion poisoning in Pakistan malaria workers, *Lancet*, 1: 31–34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90375-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90375-6)
- Barratt BIP, Moran VC, Bigler F, van Lenteren JC (2018). The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *Biol Control*, 63: 155–167. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>

- Batool R, Umer MJ, Wang Y, He K, Zhang T, Bai S, Zhi Y, Chen J, Wang Z (2020). Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma asperellum* to induce maize (*Zea mays* L.) defense against the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera, Crambidae) and larval immune response. *Int J Mol Sci*, 3;21(21): 8215. <https://doi.org/10.3390/ijms21218215>. PMID: 33153030; PMCID: PMC7663379.
- Biedermann PHW, Klepzig KD, Taborsky M (2011). Costs of delayed dispersal and alloparental care in the fungus-cultivating ambrosia beetle *Xyleborus affinis* Eichhoff (Scolytinae: Curculionidae). *Behav Ecol Sociobiol*, 65(9): 1753–1761. <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1183-5>
- Biedermann PHW (2020). Cooperative breeding in the ambrosia beetle *Xyleborus affinis* and management of its fungal symbionts. *Front Ecol Evol*, 8: 518954. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.518954>
- Carrillo D, Crane JH, Peña JE (2013). Potential of contact insecticides to control *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae), a vector of laurel wilt disease in avocados. *J Econ Entomol*, 106(6): 2286–2295. <https://doi.org/10.1603/EC13205>
- Carrillo D, Duncan RE, Ploetz JN, Campbell AF, Ploetz RC, Peña JE (2014). Lateral transfer of a phytopathogenic symbiont among native and exotic ambrosia beetles. *Plant Pathol*, 63: 54–62. <https://doi.org/10.1111/ppa.12073>
- Carro-Huerga G, Compant S, Gorfer M, Cardoza RE, Schmoll M, Gutiérrez S, Casquero PA (2020). Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: Biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*. *Front Plant Sci*, 11: 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01170>
- Castillo-Minjarez JM, Garza-López PM, Barrios-González J, Loera O (2019). Free conidia of entomopathogenic fungi modify quality traits by changing glutathione levels after an oxidant stimulus. *Biol Control*, 137: 104011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104011>
- Castrillo LA, Griggs MH, Vandenberg JD (2016). Competition between biological control fungi and fungal symbionts of ambrosia beetles *Xylosandrus crassiusculus* and *X. germanus* (Coleoptera: Curculionidae): Mycelial interactions and impact on beetle brood production. *Biol Control*, 103: 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.005>
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (2022). Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. Último acceso: 3 de enero 2022 <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
- Cooperband M, Stouthamer R, Carrillo D, Eskalen A, Thibault T, Cossé A, Castrillo L, Vandenberg J, Rugman-Jones P (2016). Biology of two members of the *Euwallacea fornicatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), recently invasive in the U.S.A., reared

- on an ambrosia beetle artificial diet. *Agric For Entomol*, 18: 223–237. <https://doi.org/10.1111/afe.12155>
- Crane J, Carrillo D, Evans E, Gazis R, Schaffer B, Ballen F, Wasielewski J (2020). Recommendations for control and mitigation of laurel wilt and ambrosia beetle vectors in commercial avocado groves in Florida. *EDIS*, HS1360. https://www.researchgate.net/publication/346495073_Recommendations_for_Control_and_Mitigation_of_Laurel_Wilt_and_Ambrosia_Beetle_Vectors_in_Commercial_Avocado_Groves_in_Florida
- Cruz LF, Menocal O, Mantilla J, Ibarra-Juarez LA, Carrillo D (2019). *Xyleborus volvulus* (Coleoptera: Curculionidae): Biology and fungal associates. *Appl Environ Microbiol*, 85(19): e01190-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01190-19>
- Dang K, Doggett SL, Veera Singham G, Lee CY (2017). Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae). *Parasit Vectors*, 29;10(1): 318. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2232-3>
- Delmore JE, Appelhans AD (1991). Detection of agricultural chemical residues on plant leaf surfaces with secondary ion mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*, 20: 237–46. <https://doi.org/10.1002/bms.1200200502>
- Dunlap C, Lueschow S, Carrillo D, Rooney A (2016). Screening of bacteria for antagonistic activity against phytopathogens of avocados. *Plant Gene*, 11: 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2016.11.004>
- Eatough Jones M, Kabashima J, Eskalen A, Dimson M, Mayorquin J, Carrillo J, Hanlon C, Paine T (2017). Evaluations of insecticides and fungicides for reducing attack rates of a new invasive ambrosia beetle (*Euwallacea* sp., Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in infested landscape trees in California. *J Econ Entomol*, 110(4): 1611–1618. <https://doi.org/10.1093/jee/tox163>
- El_Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium Wilt. *Plant Pathol J*, 31(1): 50–60. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087>
- Elad Y, Chet I, Boyle P, Henis Y (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*—scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathol*, 73: 85–88. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-85>
- Eskalen A, Stouthamer R, Lynch SC, Rugman-Jones PF, Twizeyimana M, Gonzalez A, Thibault T (2013). Host range of Fusarium dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Dis*, 97: 938–951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2021). Production/Crops/World, Avocados for 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Division (FAOSTAT). Último acceso: 24 de noviembre 2021. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

- García-Ortiz N, Tlecuitl-Beristain S, Favela-Torres E, Loera O (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 2783–2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>
- Giese EC, Dekker RFH, Scarminio IS, Barbosa AM, da Silva R (2011). Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. *Biochem Eng J*, 53(2): 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.013>.
- Goda SK, Elsayed IE, Khodair TA, El-Sayed W, Mohamed ME (2010). Screening for and isolation and identification of Malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the Malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. *Biodegradation*, 21(6): 903–913. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9350-3>
- Gomez FD, Lin W, Gao L, Li Y (2019). New host plant records for the *Euwallacea fornicatus* (Eichhoff) species complex (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) across its natural and introduced distribution. *J Asia Pac Entomol*, 22(1): 338–340. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.01.013>
- Grosman DM, Eskalen A, Brownie C (2019). Evaluation of emamectin benzoate and propiconazole for management of a new invasive shot hole borer (*Euwallacea nr. fornicatus*, Coleoptera: Curculionidae) and symbiotic fungi in California sycamores. *J Econ Entomol*, 112(3): 1267–1273. <https://doi.org/10.1093/jee/toy423>
- Gugliuzzo A, Biedermann PHW, Carrillo D, Castrillo L, Egonyu J, Gallego D, Haddi K, Hulcr J, Jactel H, Kajimura H, Kamata N, Meurisse N, Li Y, Oliver JB, Ranger CM, Rassati D, Stelinski LL, Sutherland R, Garzia G, Wright MG, Biondi A (2021). Recent advances toward the sustainable management of invasive *Xylosandrus* ambrosia beetles. *J Pest Sci*, 94: 615–637. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01382-3>
- Hughes MA, Smith JA, Ploetz RC, Kendra PE, Mayfield AE, Hanula JL, Hulcr J, Stelinski LL, Cameron S, Riggins JJ, Carrillo D, Rabaglia R, Eickwort J, Pernas T (2015). Recovery plant for laurel wilt on redbay and other forest species caused by *Raffaelea lauricola* and disseminated by *Xyleborus glabratus*. *Plant Health Prog*, 16(4): 173–210. <https://doi.org/10.1094/PHP-RP-15-0017>
- Hulcr J, Stelinski LL (2017). The ambrosia symbiosis: from evolutionary ecology to practical management. *Annu Rev Entomol*, 62(1): 285–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035105>
- Ibarra-Juarez LA, Burton MAJ, Biedermann PHW, Cruz L, Desgarennes D, Ibarra-Laclette E, Latorre A, Alonso-Sánchez A, Villafan E., Hanako-Rosas G., López L., Vázquez-Rosas-Landa M, Carrion G, Carrillo D, Moya A, Lamelas A (2020). Evidence for succession and putative metabolic roles of fungi and bacteria in the farming mutualism of the ambrosia beetle *Xyleborus affinis*. *Msystems*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00541-20>

- Kaur I, Mathur RP, Tandon SN, Dureja P (1997). Identification of metabolites of malathion in plant, water and soil by GC-MS. *Biomed Chromatogr*, 11: 352–355. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0801\(199711\)11:6%3C352::aid-bmc691%3E3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0801(199711)11:6%3C352::aid-bmc691%3E3.0.co;2-7)
- Jia M, Cao G, Li Y, Tu X, Wang G, Nong X, Whitman DW, Zhang Z (2016). Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). *Sci Rep*, 6: 28424. <https://doi.org/10.1038/srep28424>
- Kabashima J, Dimson M (2014). The polyphagous shot hole borer: a new tree pest in southern California. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. *UCNFA News*. Último acceso: 24 de enero 2022. http://ucanr.edu/sites/UCNFAnews/Feature_Stories/Polyphagous_Shot_Hole_Borer/
- Katayama A, Matsumura F (1993) Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environ Toxicol Chem*, 12: 1059–1065. <https://doi.org/10.1002/etc.5620120612>
- Kumar SS, Ghosh P, Malyan SK, Sharma J, Kumar V (2019). A comprehensive review on enzymatic degradation of the organophosphate pesticide malathion in the environment. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol*, 37(4): 288–329. <https://doi.org/10.1080/10590501.2019.1654809>.
- Leck, A. (1999). Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health*, 12, 24. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1706009/pdf/jceh_12_30_024.3.pdf
- Lira-Noriega A, Soberón J, Equihua J (2018). Potential invasion of exotic ambrosia beetles *Xyleborus glabratus* and *Euwallacea* sp. in Mexico: a major threat for native and cultivated forest ecosystems. *Sci Rep*, 8: 10179. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28517-4>
- Marik T, Tyagi C, Racić G, Rakk D, Szekeres A, Vágvyölyi C, Kredics L (2018). New 19-residue peptaibols from *Trichoderma* clade *viride*. *Microorganisms*, 6(3): 85. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030085>
- Matsumura F, Boush GM (1966). Malathion degradation by *Trichoderma viride* and a *Pseudomonas* species. *Science*, 153(3741): 1278–1280. <https://doi.org/10.1126/science.153.3741.1278>
- Miranda-Hernández F, Garza-López M, Loera O (2016). Cellular signaling in cross protection: an alternative to improve mycopesticides. *Biol Control*, 103: 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.007>
- Mishra N, Khan SS, Sundari SK (2016). Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. *World J Microbiol Biotechnol* 32: 130. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2086-4>

- Mohamed AKA, Pratt JP, Nelson FRS (1987). Compatability of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia*, 99(2): 99–105. <https://doi.org/10.1007/bf00436913>
- Montesinos-Matías R, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Serna-Domínguez MGB, Laureano-Ahuelicán MA, Ayala-Zermeño A, Ordáz-Hernández JA, López-Buenfil HC, Arredondo-Bernal H (2019). Characterization of *Beauveria bassiana* isolates associated with *Euwallacea* sp. nr. *forficatus* in *Populus* sp. *Southwest Entomolog*, 44(2): 423–429. <https://doi.org/10.3958/059.044.0207>
- Mostafa IY, Bahig MRE, Fakhr IMI, Adam Y (1972). Metabolism of organophosphorous insecticides. XIV. Malathion Breakdown by Soil Fungi. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 27(9): 1115–1116. <https://doi.org/10.1515/znb-1972-0944>
- Mulla MS, Mian LS, Kawecki JA (1981). Distribution, transport, and fate of the insecticides Malathion and parathion in the environment. *Residue Reviews*, 1–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5972-5_1
- Muñiz-Paredes F, Miranda-Hernández F, Loera O (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J Microbiol Biotechnol*, 33: 57. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
- Niassy S, Maniania NK, Subramanian S, Gitonga ML, Maranga R, Obonyo AB, Ekesi S (2012). Compatibility of *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 69 with agrochemicals used in French bean production. *International J Pest Manag*, 58(2): 131–137. <https://doi.org/10.1080/09670874.2012.669078>
- Noronha EF, Ulhoa CJ (2000). Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol*, 183(1): 119–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08944.x>
- Paris DF, Lewis DL, Lee Wolfe N (1975). Rates of degradation of Malathion by bacteria isolated from aquatic system. *Environ Science Technol*, 9(2): 135–138. <https://doi.org/10.1021/es60100a011>
- Pelizza SA, Schalamuk S, Simón MR, Stenglein SA, Pacheco-Marino SG, Scorsetti AC (2018). Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2): 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.002>
- Pisi A, Roberti R, Zakrisson E, Filippini G, Mantovani W, Cesari A (2001). SEM investigation about hyphal relationships between some antagonistic fungi against *Fusarium* spp. foot rot pathogen of wheat. *Phytopathol Mediterr*, 40: 37–44. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1588
- Premack R (2017). The Avocado Craze Hits Asia. *Forbes*. Publicado el 31 de octubre de 2017. Último acceso: 23 de noviembre 2021. <https://www.forbes.com/sites/rachelpremack/2017/10/31/the-avocado-craze-hits-asia/?sh=5d21025f6e5f>

- Quesnel LB, (1969). Methods of microculture. *Methods Microbiol*, 1: 365–425. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70141-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70141-7)
- Romero-Arenas O, Lezama C, Morales PLM, Olguín JF, Jarquín D (2018). Biological control of *Fusarium oxysporum* in tomato seedling production with mexican strains of *Trichoderma*. *Intechopen*, 10: 155–168. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72878>.
- Sánchez-Rangel D, Hernández-Domínguez EE, Pérez-Torres CA, Ortiz-Castro R, Villafán E, Rodríguez-Haas B, Alonso-Sánchez A, López-Buenfil A, Carrillo-Ortiz N, Hernández-Ramos L, Ibarra-Laclette E, (2018). Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *forficatus*. *BMC Genomics*, 19: 721. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5083-1>
- Sasan RK, Bidochka MJ (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am J Bot*, 99: 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol*, 60(12): 4364–4370. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4364-4370.1994>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SADER-SENASICA) (2018). Manejo fitosanitario de los ambrosiales. Décimo segundo informe mensual. *SENASICA*. Publicado en diciembre 2018. Último acceso: 19 de enero 2022. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427458/Informe_No__12_Diciembre_2018_Ambrosiales.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SADER-SENASICA) (2019a). Complejo escarabajo ambrosia del laurel rojo *Xyleborus glabratus* - *Raffaelea lauricola* Ficha Técnica No. 48. *SENASICA*. Publicado en mayo 2019. Último acceso: 19 de enero 2022. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466350/5.Ficha_Tecnica_Complejo_escarabajo_ambrosia_del_laurel_rojo.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SADER-SENASICA) (2019b). Complejo escarabajo barrenador polífago *Euwallacea* sp. - *Fusarium euwallaceae* Ficha Técnica No. 62. *SENASICA*. Publicado en mayo 2019. Último acceso: 19 de enero 2022. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466339/27.Ficha_Tecnica_Complejo_escarabajo_barrenador_polifago.pdf
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SAGARPA-SENASICA) (2016) Plan de acción para la vigilancia y aplicación de medidas de control contra complejos ambrosiales reglamentados en México: *Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y

- Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*. Manuales operativos de plagas cuarentenarias. SENASICA. Publicado en julio de 2016. Último acceso: 27 de diciembre 2021. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Manuales%20operativos/Plan%20de%20accion%20Complejos%20ambrosiales.pdf>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (2020) Manejo fitosanitario de los ambrosiales. SENASICA. Publicado el 10 de febrero de 2020. Último acceso: 24 de noviembre 2021. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/manejo-fitosanitario-de-los-ambrosiales?state=published>
- Shan X, Junxin L, Lin L, Chuanling Q (2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *J Environ Sci*, 21: 76–82. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60014-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60014-0)
- Sidhu GK, Singh S, Kumar V, Dhanjal DS, Datta S, Singh J (2019). Toxicity, monitoring and biodegradation of organophosphate pesticides: a review. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 49(13): 1135–1187. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1565554>
- Singh B, Kaur J, Singh K (2013). Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. *Crit Rev Microbiol*, 40(2): 146–54. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763222>
- Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM) (2021). Mercados nacionales agrícolas, precios al mayoreo de frutas y hortalizas en pesos mexicanos por presentación comercial. Publicado el 22 de noviembre de 2021. Último acceso: 23 de noviembre 2021. <http://www.economia-sniim.gob.mx/Nuevo/Home.aspx?opcion=Consultas/MercadosNacionales/PreciosDeMercado/Agricolas/ConsultaFrutasYHortalizas.aspx?SubOpcion=4|0>
- Staley ZR, Harwood VJ, Rohr JR (2015). A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. *Crit Rev Toxicol*, 45(10): 813–836. doi:10.3109/10408444.2015.1065471
- Stouthamer R, Rugman-Jones P, Thu PQ, Eskalen A, Thibault T, Hulcr J, Lin CS (2017). Tracing the origin of a cryptic invader: phylogeography of the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) species complex. *Agr Forest Entomol*, 19: 366–375. <https://doi.org/10.1111/afe.12215>
- Rahimi-Tamandegani P, B Sharifnabi, A Massah, M Zahravi (2021). Induced reprogramming of oxidative stress responses in cucumber by *Trichoderma asperellum* (Iran 3062C) enhances defense against cucumber mosaic virus. *Biol Control*, 164(104779): 1049–9644. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104779>
- United States Department of Agriculture (USDA) (2016). Mexican Hass avocado import program. USDA. Publicado el 27 de mayo de 2016. Último acceso: 20 de enero 2022. <https://www.federalregister.gov/documents/2016/05/27/2016-12586/mexican-hass-avocado-import-program>

- Viterbo A, Horwitz B, (2010). Mycoparasitism. *Cell Mol Biol Filamentous Fungi*, 676–693. <https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch42>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press Inc*, 315–322. https://www.researchgate.net/profile/John-Taylor-21/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics/links/5680887a08ae1e63f1e95aad/Amplification-and-Direct-Sequencing-of-Fungal-Ribosomal-RNA-Genes-for-Phylogenetics.pdf
- Wood SL (1982). The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Memoirs of the Great Basin Naturalist*, 6: 1–1359. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/248626>
- Wu Q, Ni M, Wang G, Liu Q, Yu M, Tang J (2018). Omics for understanding the tolerant mechanism of *Trichoderma asperellum* TJ01 to organophosphorus pesticide dichlorvos. *BMC genomics*, 19(1): 596. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4960-y>

Anexos

Anexo 1

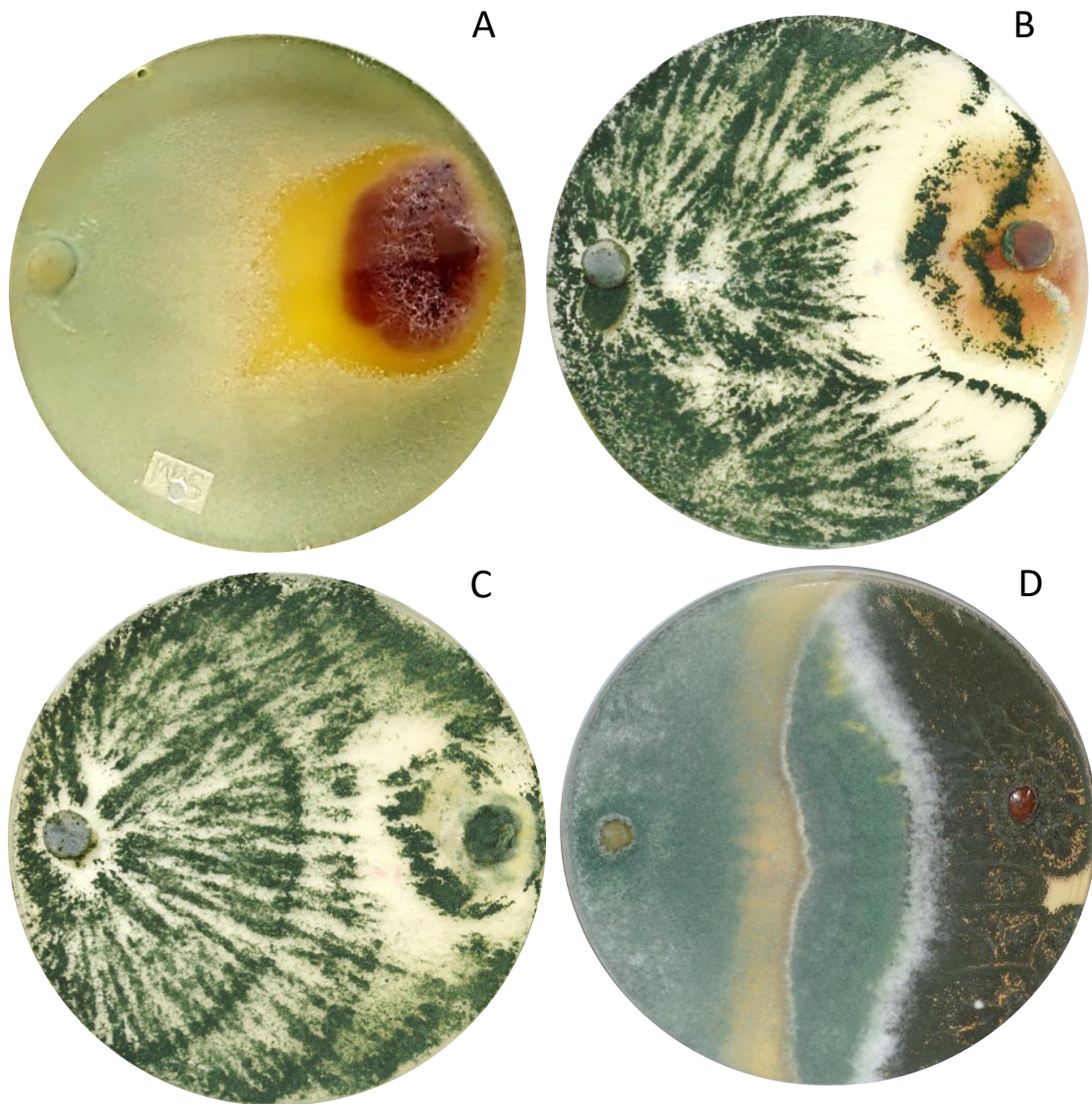
Secuencia consenso del ADN del gen de ADNr usando los cebadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990) del hongo micopatógeno *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3), anteriormente identificado como *Trichoderma harzianum* Th-T4 (3) (Romero Arenas *et al.*, 2018). La secuencia ITS se comparó directamente en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo Nucleotide BLAST.

5'GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCA
AACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCC
CGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGC
TCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCAC
ACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAG
TTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCT
GAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG3'

Anexo 2

Confrontaciones preliminares. Para la selección de cepas, se realizaron diferentes confrontaciones entre distintos hongos siguiendo una metodología similar a la de Castrillo *et al.* (2016), incubando las cepas a una temperatura de 27 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. A) *Trichoderma reesei* CDBB36 Simmons (Hypocreales: Hypocreaceae), en confrontación con *Fusarium oxysporum* AB2 Schltdl. (Hypocreales: Nectriaceae), inoculados al mismo tiempo, con 8 días de interacción en Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) (BD

Bioxon™). Se observa una coloración verde limón de *T. reesei* CDBB36 y una coloración roja de *F. oxysporum* AB2, además de un halo de inhibición por parte de *T. reesei* CDBB36, sin invadir el área



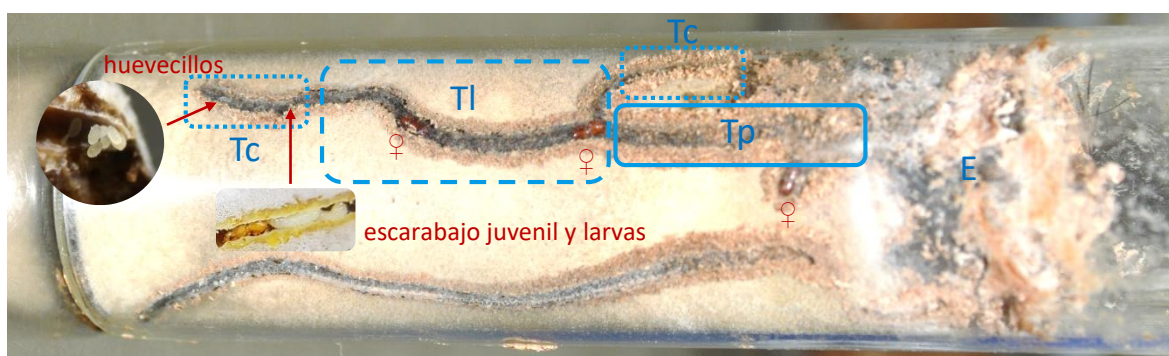
de crecimiento de *F. oxysporum* AB2. B) *T. asperellum* Th-T4 (3) en confrontación con *F. oxysporum* AB2, inoculados al mismo tiempo, con 8 días de interacción en medio PDA. Se observa una coloración verde oscura y un crecimiento circadiano de *T. asperellum* Th-T4 (3), el cual, se encuentra invadiendo la zona de *F. oxysporum* AB2, comprobando efectivamente su acción micopatógena. C) *T. asperellum* Th-T4 (3) en confrontación con *Beauveria bassiana* Tac 1.1,

inoculados al mismo tiempo, con 8 días de interacción en medio PDA. Se observa la coloración verde oscura característica de *T. asperellum* Th-T4 (3) invadiendo la zona de *B. bassiana* Tac 1.1. D) *T. asperellum* Th-T4 (3) en confrontación con *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, inoculados en diferentes tiempos, dando ventaja de 7 días a *M. robertsii* Xoch 8.1, más 8 días de interacción en medio SDA. Se observa a *M. robertsii* Xoch 8.1 a la derecha de la caja Petri, con una coloración verde oscura. Pasados 7 días, se inoculó a *T. asperellum* Th-T4 (3) teniendo una interacción de 8 días. *T. asperellum* Th-T4 (3) presentó una coloración verde azulada (a la izquierda de la caja Petri) e invadió parte del área de crecimiento de *M. robertsii* Xoch 8.1. Cabe aclarar que las cajas se revisaron 10 días después del experimento y no se observó cambio alguno.

Trichoderma reesei CDBB356 de la colección de hongos de CINVESTAV, México. *Beauveria bassiana* Tac 1.1 se encuentra depositada en la colección ENCB-IPN WDCM449 con el número de identificación ENCB-MG-82. *Fusarium oxysporum* AB2, identificada mediante ITS, pertenece a la colección de hongos entomopatógenos de la UAM-I.

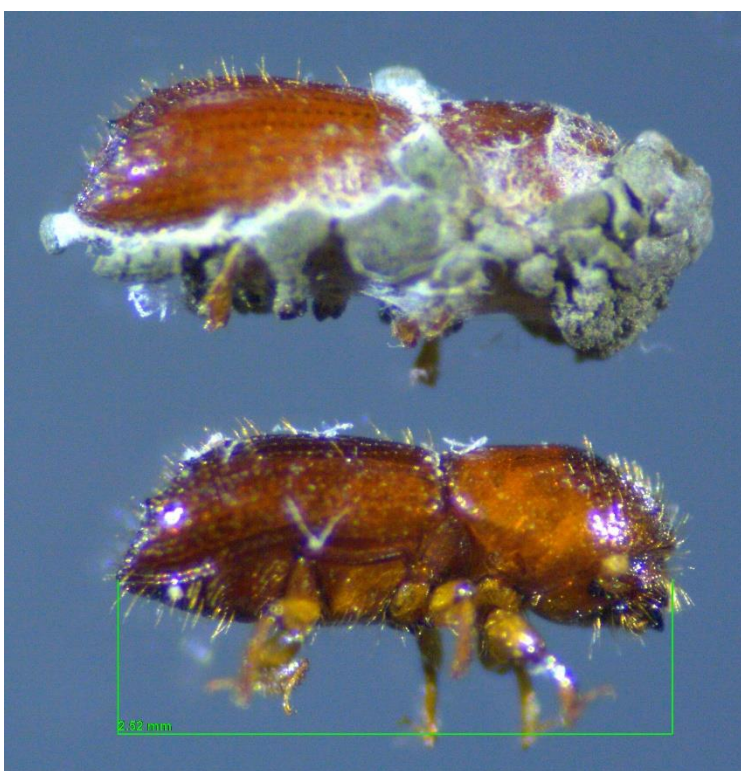
Anexo 3

Morfología de una galería artificial de *X. affinis* con 30 días de desarrollo desde su fundación consta de una entrada (E), túnel principal (Tp), túnel lateral (Tl), y túnel de cría (Tc) (Biedermann, 2020). Se observó una capa blanquecina de hongos, de la cual se alimentaron tanto las larvas como los insectos adultos. En general, la presencia de algunas larvas, huevecillos y escarabajos juveniles se observó en los Tl y Tc, mientras que los escarabajos adultos hembras (♀) en los Tp y algunos en Tl y en Tc.



Anexo 4

Imagen mostrando la infección por parte del hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 sobre el escarabajo ambrosial *Xyleborus ferrugineus* proveniente del municipio de Minatitlán, Colima, México, el cual se ha reportado como hospedero natural en el aguacate (Castrejón-Antonio *et al.*, 2020). En esta etapa experimental, se llevó a cabo un bioensayo previo con *X. ferrugineus*. Se observó el desarrollo de micosis por la cepa *M. robertsii* Xoch 8.1 (arriba), y el tratamiento testigo (abajo).



Anexo 5

En esta imagen se aprecia una confrontación triple entre *T. asperellum* Th-T4 (3), *M. robertsii* Xoch 8.1 y *F. oxysporum* AB2, en donde la inoculación se llevó a cabo de manera simultánea para todas las cepas. Se observa en todas las cajas a *T. asperellum* Th-T4 (3) verde y con un área de

crecimiento de mayor tamaño, *M. robertsii* Xoch 8.1 verde y un área de crecimiento pequeña y a *F. oxysporum* AB2 rosa y con un área de crecimiento pequeña. Se muestra la interacción a los 2 (A), 5 (B) y 7 (C) días de crecimiento. En esta interacción cabe destacar que *T. asperellum* Th-T4 (3) no invade las cepas de *M. robertsii* Xoch 8.1 y *F. oxysporum* AB2 pero detiene su crecimiento (C).

