



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

“Resistencia a Tebuconazol en cepas de *Akanthomyces lecanii*

a partir de radiación UV y presión selectiva en

Arenas de Crecimiento y Evolución Microbiana”

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M. en E. A. Arturo Enrique Miranda Calixto

Matrícula: 2183802095

ORCID: 0000-0002-4563-6956

Correo electrónico: arturo.mc@live.com

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Octavio Loera Corral

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

ASESOR

Dr. Marcos López Pérez

JURADO

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario: Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Vocal: Dr. Marcos Lopez Perez

Vocal: Dra. Flor de Maria Cuervo Lopez

Iztapalapa, Ciudad de México a 10 de abril de 2026



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de la SECIHTI con la referencia 121636.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. Se contó con el financiamiento de la UAM-Iztapalapa, el CONACyT mediante el Programa Especial de Apoyo a la Investigación 2019, 14501024.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Fecha : 09/04/2026

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 BIOTECNOLOGÍA del alumno ARTURO ENRIQUE MIRANDA CALIXTO, matrícula 2183802095, quien cumplió con los 316 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha diez de abril del 2026 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Resistencia a Tebuconazol en cepas de *Akanthomyces Iecanii* a partir de radiación UV y presión selectiva en Arenas de Crecimiento y Evolución Microbiana.

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**

Presidenta

DRA. ARACELI TOMASINI CANPOCOSIO

Secretario

DR. JUAN ESTÉRAN BARRANCO FLORIDO

Vocal

DRA. FLOR DE MARTA CUERVO LOPEZ

Vocal

DR. MARCOS LOPES PEREZ

## **Agradecimientos**

Quiero dedicar y agradecer a mi mamá, Rocío Calixto Flores. Aunque ya no estás aquí, tu cariño, fuerza y todo lo que me enseñaste sigue siendo un impulso cada día.

Agradezco a los doctores Octavio Loera, Francisco Figueroa y Marcos López por su paciencia, compromiso, por compartir su conocimiento y brindar valiosos consejos durante este recorrido, así como por proporcionar los espacios y materiales de trabajo necesarios.

A la Dra. Judith Castellanos, quien ha sido una guía fundamental durante todos los años de formación que he tenido.

A mi hermana Rocío Miranda y a mis amigos Diego López, Daniela Ruiz y Melissa Martínez, por acompañarme en los buenos momentos y en los días difíciles, su apoyo hizo que este proceso fuera mucho más llevadero.

Y a todas las personas que, de alguna manera, estuvieron presentes durante esta etapa, gracias.

## Resumen

La agricultura es fundamental para distintas actividades humanas, su desarrollo y la conservación de la biodiversidad. La calidad y disponibilidad de los productos agrícolas depende de factores abióticos y bióticos. Entre estos últimos, las plagas y las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos provocan un alto porcentaje de pérdidas y amenazan la seguridad alimentaria. Para controlar estos organismos fitopatógenos se utilizan fungicidas como el Tebuconazol (TEB), ampliamente empleado en la agricultura; sin embargo, su aplicación constante ha incrementado la aparición de cepas de hongos fitopatógenos resistentes, además su presencia reduce la efectividad de otros hongos como agentes de control biológico.

Tal es el caso del hongo entomopatógeno e hiperparásito *Akanthomyces lecanii*, adecuado para el control biológico simultáneo de plagas de insectos y hongos, pero es muy sensible a los fungicidas. Con el fin de producir cepas de *A. lecanii* que puedan utilizarse como agentes de control biológico en presencia del TEB, en este trabajo se llevó a cabo la inducción de resistencia al TEB en dos cepas silvestres de *A. lecanii* mediante radiación UV y presión selectiva en gradientes crecientes del fungicida, por medio de una modificación de la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA). A partir del proceso de mutagénesis y presión selectiva se aislaron nueve cepas de *A. lecanii* que mostraron resistencia a altas concentraciones de TEB, tres de estas cepas fueron resistentes a una concentración del fungicida diez veces mayor a la dosis recomendada en la agricultura. Además, se aislaron tres cepas resistentes a TEB adaptadas de forma natural, solo con presión selectiva. Las tasas de crecimiento, conidiación, producción de enzimas hidrolíticas y la virulencia contra el hemíptero *Coccus viridis* no se afectaron en las cepas resistentes al TEB. Por otro lado, al evaluar las cepas obtenidas como micoparásito de *Cladosporium* sp., se observó un efecto sinérgico entre las cepas resistentes y el fungicida.

Estas cepas tendrán una mayor oportunidad de desarrollarse y establecerse en ambiente donde el fungicida está presente, y pueden ser utilizadas en estrategias donde se combinen agentes biológicos y químicos para mejorar el control de insectos y hongos fitopatógenos en la agricultura. Además, la metodología de presión selectiva mediante la placa MEGA modificada puede emplearse para mejorar la adaptación de hongos entomopatógenos, por ejemplo, que sean resistentes a otros tipos de estrés abiótico que limitan su efectividad en el control de plagas.

Palabras clave: *Akanthomyces lecanii*, Tebuconazol, Radiación UV, Presión selectiva, Control biológico, Fungicida.

## Abstract

Agriculture is fundamental for various human activities, its development, and the conservation of biodiversity. The quality and availability of agricultural products depend on abiotic and biotic factors. Among the later, pests and fungal diseases cause a high percentage of losses and threaten food security. To control these phytopathogenic organisms, fungicides such as Tebuconazole (TEB), widely used in agriculture, are employed. However, its constant application has increased the emergence of resistant phytopathogenic fungal strains, and its presence also reduces the effectiveness of other fungi used as biological control agents. Such is the case of the entomopathogenic and hyperparasitic fungus *Akanthomyces lecanii*, suitable for the simultaneous biological control of insect and fungal pests, but highly sensitive to fungicides.

In order to produce *A. lecanii* strains that can be used as biological control agents in the presence of TEB, this work carried out the induction of TEB resistance in two wild strains of *A. lecanii* through UV radiation and selective pressure in increasing gradients of the fungicide, using a modified Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA). From the mutagenesis and selective pressure process, nine *A. lecanii* strains and three naturally adapted ones were isolated, showing resistance to high concentrations of TEB relative to the dose recommended in agriculture. Three of the irradiated strains were resistant to a concentration of the fungicide ten times higher. Moreover, growth rate, conidiation, production of hydrolytic enzymes, and virulence against the hemipteran *Coccus viridis* were not affected in the TEB-resistant strains. When the TEB-resistant strains were evaluated as mycoparasites of *Cladosporium* sp., a synergistic effect between selected strains and the fungicide was observed.

These strains will have a greater opportunity to develop and establish in environments where the fungicide is present and can be used in strategies combining biological and chemical agents to improve the control of insect and phytopathogenic fungal pests in agriculture. Additionally, the selective pressure methodology using the modified MEGA plate can be employed to improve the adaptation of entomopathogenic fungi, for instance, to develop resistance to other types of abiotic stress that limit their effectiveness in pest control.

Key Words: *Akanthomyces lecanii*, Tebuconazole, UV-radiation, Selective pressure, Biological control, Fungicide.

## Índice general

1. Introducción .....	1
2. Marco Teórico.....	4
2.1. Efecto de las plagas y enfermedades en la seguridad alimentaria.....	4
2.2. Estrategias para el control de plagas y enfermedades .....	5
2.2.1. Control químico.....	5
2.2.2. Fungicidas .....	7
2.2.3. Tebuconazol.....	7
2.2.4. Resistencia al Tebuconazol.....	8
2.3. Control biológico .....	10
2.3.1. Hongos entomopatógenos .....	11
2.3.2. Mecanismo de acción.....	11
2.3.3. Hongos micopatógenos .....	12
2.3.4. <i>Akanthomyces lecanii</i> .....	13
2.4. Estrategias para el mejoramiento de cepas .....	13
2.4.1. Ingeniería genética.....	14
2.4.2. Mutación por radiación UV.....	15
2.4.2.1. Casos favorables de mutagénesis por radiación UV-C .....	15
2.4.3. Presión selectiva .....	17
2.4.3.1. Casos favorables de presión selectiva .....	18
3. Justificación .....	20
4. Hipótesis .....	22
5. Objetivos.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos particulares .....	23
6. Diagrama metodológico.....	24
7. Metodología .....	25
7.1. Material biológico.....	25
7.2. Concentración mínima inhibitoria de TEB en <i>A. lecanii</i> .....	25
7.3. Mutagénesis por radiación UV-C .....	26
7.4. Desarrollo de la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA) .....	27
7.5. Cultivo en la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA) .....	28
7.6. Comparación del crecimiento y conidiación de los aislados WT y UV.....	30
7.7. Estimación semicuantitativa de la producción de proteasas, lipasas y quitinasas.....	30
7.8. Bioensayo de <i>A. lecanii</i> contra <i>Coccus viridis</i> .....	30

7.9. Bioensayo de <i>A. lecanii</i> contra <i>Cladosporium</i> sp. ....	31
7.10. Análisis estadístico.....	32
8. Resultados.....	33
8.1. Concentración mínima inhibitoria de TEB en <i>A. lecanii</i> .....	33
8.2. Mutagénesis por radiación UV .....	33
8.3. Cultivo en la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA) .....	35
8.4. Comparación del crecimiento y conidiación de los aislados WT y UV.....	37
8.5. Estimación semicuantitativa de la producción de proteasas, lipasas y quitinasas.....	38
8.6. Bioensayo de <i>A. lecanii</i> contra <i>Coccus viridis</i> .....	39
8.7. Bioensayo de <i>A. lecanii</i> contra <i>Cladosporium</i> sp. ....	41
9. Discusión.....	45
10. Conclusiones.....	51
11. Perspectivas.....	52
12. Literatura citada .....	53
13. Anexo.....	71

## Índice de figuras

Fig. 1. Estructura química de distintos plaguicidas utilizados en la agricultura. ....	6
Fig. 2. Estructura química del Tebuconazol.....	8
Fig. 3. Proceso de evolución de la resistencia a fungicidas, donde la población inicial presenta una alta susceptibilidad, después de la aplicación repetida de un agroquímico, la densidad poblacional cambia y presenta un aumento de organismos resistentes. ....	9
Fig. 4. Mecanismos de resistencia a fungicidas de un solo sitio de acción.....	10
Fig. 5. Proceso de patogenicidad fúngica contra insectos.....	12
Fig. 6. Placa MEGA modificada de Baym et al. (2016), adaptada al crecimiento fúngico. ....	28
Fig. 7. Vista superior de la placa MEGA. ....	29
Fig. 8. Estimación de la supervivencia (%) en las cepas EH-348/2WT y EH-459WT en función del tiempo de exposición (s) a radiación UV.....	34
Fig. 9. Crecimiento de <i>A. lecanii</i> en la placa MEGA a través del tiempo. ....	36
Fig. 10. Cinética de mortalidad de <i>C. viridis</i> expuestos a conidios de diferentes cepas de <i>A. lecanii</i> . ....	40
Fig. 11. Comparación del desarrollo micelial de <i>Cladosporium</i> (mm <sup>2</sup> ) y efecto micoparasítico de las cepas WT y UV de <i>A. lecanii</i> (%). ....	44

## Índice de tablas

Tabla. 1. Crecimiento radial y producción de conidios de <i>Akanthomyces lecanii</i> en medios de cultivo con y sin TEB. ....	33
Tabla. 2. Crecimiento radial y producción de conidios en <i>A. lecanii</i> EH-348/2WT, EH-459WT y las cepas aisladas de la placa MEGA usando medio de cultivo con y sin TEB. ....	37
Tabla. 3. Determinación semicuantitativa (índice de potencia, IP) de la actividad de proteasas, lipasas y quitinasas en <i>A. lecanii</i> EH-348/2WT, EH-459WT y las cepas resistentes a TEB obtenidas de la placa MEGA. Menor IP indica una mayor actividad enzimática. ....	38
Tabla. 4. Crecimiento de las cepas WT y UV de <i>A. lecanii</i> sin TEB y con concentraciones (mg/l) de 1.43, 2.87, y 4.31 de TEB. ....	42

## 1. Introducción

La agricultura es una actividad estratégica fundamental para la humanidad ya que proporciona alimentos, genera empleos, proporciona materia prima a distintas industrias, contribuye al desarrollo rural y ayuda a la conservación de la biodiversidad (Lichtfouse *et al.*, 2009; Bournaris *et al.*, 2016). Para que la producción agrícola pueda cubrir los requerimientos de la población mundial, se ha estimado que debe aumentar en un 60 % la producción para el año 2050, fecha en la que se proyecta que la población mundial alcanzará un aproximado de 10 mil millones de personas (FAO, 2019).

La producción agrícola constituye más del 80 % de la dieta humana y es la principal fuente de alimento del ganado, por lo que es necesario un acceso permanente a alimentos seguros y nutritivos para mantener las distintas poblaciones saludables y productivas (FAO, 2020; Boa *et al.*, 2015). Para cumplir con este requerimiento, se debe considerar la salud vegetal como un elemento crítico que permite mantener la seguridad alimentaria y preservar la salud humana, animal y el equilibrio ambiental (Rizzo *et al.*, 2021).

La calidad y la disponibilidad de la producción agrícola están amenazadas por factores tanto abióticos (sequías, salinidad, altas temperaturas y contaminación por metales pesados), como por factores bióticos (plagas y enfermedades) que resultan en una pérdida anual de entre el 20 a 40 % de la producción global (FAO, 2022). Entre los organismos que generan un mayor daño se encuentran los hongos fitopatógenos (Jankielsohn, 2018; Mehmood *et al.*, 2025; Sharma, 2021), su presencia genera un riesgo grave para la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental. Además, las modificaciones ambientales debido al cambio climático han favorecido el establecimiento de agentes patógenos e impulsado la aparición de nuevas cepas, así como su dispersión a nuevas regiones (Singh *et al.*, 2023).

Para combatir las plagas y enfermedades, se han empleado distintas estrategias en las que se incluye al control químico como la medida más común, donde se emplean plaguicidas específicos para los diferentes tipos de agentes patógenos. Se estima que, a nivel mundial, la aplicación de ingredientes activos de estos compuestos es de 3.37 millones de toneladas. De los cuales, los fungicidas y bactericidas representan un 22 % (FAO, 2025).

Aunque los plaguicidas químicos tienen un rápido efecto, provocan repercusiones ambientales graves, como la degradación y alteración de la fertilidad del suelo, modificación de la microbiota, contaminación de aguas superficiales y subterráneas, daño a organismos polinizadores y riesgos directos para los agricultores y consumidores, a los que pueden causar trastornos neurológicos, reproductivos e incrementar el riesgo de cáncer (FAO, 2023; Arce-Estrada *et al.*, 2025; Hossain *et al.*, 2022; Malik *et al.*, 2017; Mandal *et al.*, 2020; Kaur y Sinha, 2019; Maggi y Chreil, 2023; Anjaria y Vaghela, 2024; Anaduaka *et al.*, 2023; Rossetti *et al.*, 2020; Said, 2023). Adicionalmente, el uso constante y desmedido de estos agroquímicos ha

favorecido la aparición de resistencia en las plagas, situación que ha requerido de la utilización de dosis mayores, emplear una gama más amplia de productos y ha incrementado la presión ambiental sobre la microbiota nativa presente en los agroecosistemas (Anjaria y Vaghela, 2024).

En el caso específico del fungicida Tebuconazol, este se ha empleado ampliamente en la agricultura por su acción sistémica y por ser de amplio espectro. El tebuconazol es un antimicótico triazólico que inhibe la síntesis de ergosterol al interferir con el citocromo P450 (Yoshida y Aoyama, 1987; Zhao *et al.*, 2022), por lo que protege, cura y elimina las infecciones fúngicas (Klix *et al.*, 2007; Damicone, 2016). Sin embargo, su uso continuo ha ejercido una presión selectiva en distintas especies de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Malandrakis *et al.*, 2015), *Pyricularia* spp. (Dorigan *et al.*, 2017), y *Monilinia fructicola* (Lichtemberg *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2019), así como en el hongo patógeno para humanos *Aspergillus fumigatus* (Cui *et al.*, 2019; Kemoi *et al.*, 2018; Jeanvoine *et al.* 2020). Diversos estudios, han descrito modificaciones en el sitio de acción, sobreexpresión de proteínas objetivo, sobreexpresión de bombas de eflujo, como mecanismos de resistencia a este antimicótico (Deising *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2015; Sierotzki y Scalliet, 2013; Chen *et al.*, 2013; Sánchez-Torres, 2021).

El control biológico es otra estrategia en el manejo y contención de plagas, se plantea como una alternativa para evitar los problemas ambientales ocasionados por los plaguicidas químicos. Esta técnica introduce enemigos naturales de los organismos fitopatógenos para suprimir las poblaciones por debajo del daño económico (Stoner, 2004; Pal y McSpadden, 2006; Blackburn *et al.*, 2016). Entre los organismos utilizados como agentes de control biológico se encuentran los hongos entomopatógenos y micoparásitos, que tienen un rango amplio de hospederos, representan un bajo riesgo ambiental y tienen una menor probabilidad de inducir resistencia (Rai *et al.*, 2014).

El hongo *Akanthomyces lecanii*, es un agente de control biológico que se ha reportado como entomopatógeno (Shinde *et al.*, 2010; Mier *et al.* 1991; Amini *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2005; Goettel *et al.*, 2008), y micoparásito (Eskes *et al.*, 1991; Vandermeer *et al.*, 2009; Canjura-Saravia, 2002; González y Surís, 2007; Jackson *et al.*, 2012). Sin embargo, al ser utilizado en campo, la presencia residual de algunos agroquímicos limita su desarrollo, colonización y eficacia (Reddy *et al.*, 2018; Castellanos-González *et al.*, 2011), lo que impide su implementación efectiva en sitios contaminados con el fungicida.

Ante las limitaciones ejercidas por el ambiente, como la presencia de plaguicidas químicos, así como la necesidad por incrementar la velocidad de acción y efectividad de los agentes de control biológico fúngico, se han implementado distintas técnicas para obtener variantes capaces de sobreponerse a estas restricciones. Una de ellas es el mejoramiento mediante ingeniería genética que ha permitido aumentar la virulencia en cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (St. Leger y Wang, 2010; Mascarín *et al.*, 2025).

Sin embargo, esta estrategia enfrenta barreras como la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados que limitan su implementación en campo.

Por otra parte, la mutagénesis por radiación ultravioleta combinada con presión selectiva se considera como una alternativa a la ingeniería genética y que no cuenta con las limitaciones de implementación (Gao *et al*, 2025). De esta forma, se ha logrado que distintos aislados conserven su virulencia o se vea incrementada como es el caso de *Beauveria bassiana*, donde se observó un incremento significativo de la eficacia infectiva de las cepas mutantes (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009). De igual forma, esta estrategia ha permitido la obtención de cepas resistentes a compuestos, como el propamocarb en experimentos de radiación UV-C en cepas de *Lecanicillium lecanii* (Xie *et al.*, 2018).

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Efecto de las plagas y enfermedades en la seguridad alimentaria**

La agricultura constituye un proceso de producción indispensable que contribuye sustancialmente con cada sociedad y economía, provee aportes primarios, alimento, ingresos y empleo. También, está relacionada con la calidad y provisión segura de alimentos, protección ambiental, desarrollo rural integrado y ayuda a salvaguardar la estructura de áreas rurales (Lichtfouse *et al.*, 2009; Bournaris *et al.*, 2016). Sin embargo, debido al crecimiento poblacional, se estima que será necesario aumentar la producción de alimentos a nivel global en un 60 % para cubrir las necesidades de cerca de 10 mil millones de personas para el 2050 (FAO, 2019).

Para asegurar un mayor rendimiento agrícola y el abastecimiento de alimento para la población mundial, se debe considerar la salud vegetal como eje vital para sostener tanto la salud humana, como animal. También debe ser considerada como componente crítico de la interacción compleja con el ambiente y los organismos presentes en él (Rizzo *et al.*, 2021).

La salud vegetal es un componente importante de la seguridad alimentaria como medio de vida en la agricultura, suministro de materia para la industria farmacéutica y la calidad ambiental (Fletcher *et al.*, 2009; Boa *et al.*, 2015). Debido a que las plantas proveen más del 80 % del alimento consumido por humanos y son la principal fuente de comida para el ganado (FAO, 2020), se debe considerar a la seguridad alimentaria como el estado de acceso confiable a alimento seguro, suficiente, nutritivo y asequible a todo tiempo para contar con sociedades saludables y productivas (Boa *et al.*, 2015).

La disponibilidad y calidad de materia vegetal está influenciado por estrés abiótico como la sequía, salinidad, temperatura y la acumulación de metales pesados, así como por estresores bióticos como la presencia de plagas y enfermedades que reducen el rendimiento de cultivos y provoca detrimento de su calidad (Maheswari *et al.*, 2011). Las enfermedades vegetales resultan en una pérdida anual estimada de 20 a 40 % de la producción global, que representa un costo económico de cerca de 220 mil millones de dólares (FAO, 2022).

Entre los organismos que provocan daño a la agricultura se encuentran los insectos, que afectan el 18 % de la producción mundial (Jankielsohn, 2018). Además, se consideran como la mayor fuente de estrés biótico en los cultivos (Mehmood *et al.*, 2025). Por otra parte, están los hongos fitopatógenos, que son los organismos dominantes en enfermedades vegetales, y han sido relacionados con un impacto de entre un 70 y 80 % de las pérdidas de la producción agrícola; estos organismos representan el grupo ecológico que genera la mayor amenaza económica para los cultivos (Sharma, 2021).

La presencia de los agentes patógenos provoca un riesgo significativo a nivel global para la seguridad alimentaria y la sustentabilidad del ambiente. La pérdida de la productividad primaria y biodiversidad impacta directamente las condiciones socioeconómicas de regiones afectadas con las plagas y enfermedades. Sumado a esto, el cambio climático incrementa el riesgo de brotes por alterar la evolución de los patógenos y la interacción con los hospederos, lo que propicia la emergencia de nuevos fenotipos patógenos y finalmente deriva en un cambio del rango de los agentes patógenos, establecimiento, incremento poblacional y dispersión a nuevas regiones (Singh *et al.*, 2023).

## **2.2. Estrategias para el control de plagas y enfermedades**

La presencia de plagas y enfermedades en determinadas áreas geográficas representan riesgos como a) un cambio forzado de localización de estos cultivos, b) la aparición de cepas mejor adaptadas y con mayor virulencia que pueden diseminarse de forma más efectiva, lo que incrementa el impacto en la región (Fones *et al.*, 2017). Debido a esto, se han desarrollado distintas medidas para controlar a los organismos patógenos. Entre ellas se ha considerado el control cultural, la resistencia genética, el control químico, el control biológico y el manejo integrado de plagas (López, 1990; Cárdenas-Murillo, 1993; Zhou *et al.*, 2024); de estos, el control químico y biológico son los de más amplio uso (Shavanov *et al.*, 2022).

### **2.2.1. Control químico**

Desde el inicio de la agricultura en Mesopotamia, la humanidad se ha enfrentado con la presencia de plagas y enfermedades que amenazan la sustentabilidad de los cultivos. Por ello, la utilización de distintos compuestos se ha convertido en una práctica para solucionar estos problemas, como la adición de sulfuro para controlar insectos y termitas en Sumeria. Posterior a la segunda guerra mundial y el avance tecnológico, la industria agroquímica presentó un crecimiento significativo, que permitió el desarrollo y registro de diversos tipos de plaguicidas a nivel mundial (Umetsu *et al.*, 2020).

Además de combatir agentes patógenos existentes en los cultivos, los plaguicidas químicos (Fig. 1), se han utilizado como principal estrategia por favorecer el rendimiento de las plantas, mejorar la calidad de la cosecha y, son la primera opción por su rápida acción para combatir las plagas (Suprpta, 2012). A nivel mundial, se ha registrado la utilización de 3.73 millones de toneladas de ingredientes activos, en donde los herbicidas representan un 51 % de los plaguicidas utilizados, los insecticidas un 22 %, los fungicidas y bactericidas un 22 % (FAO, 2025).

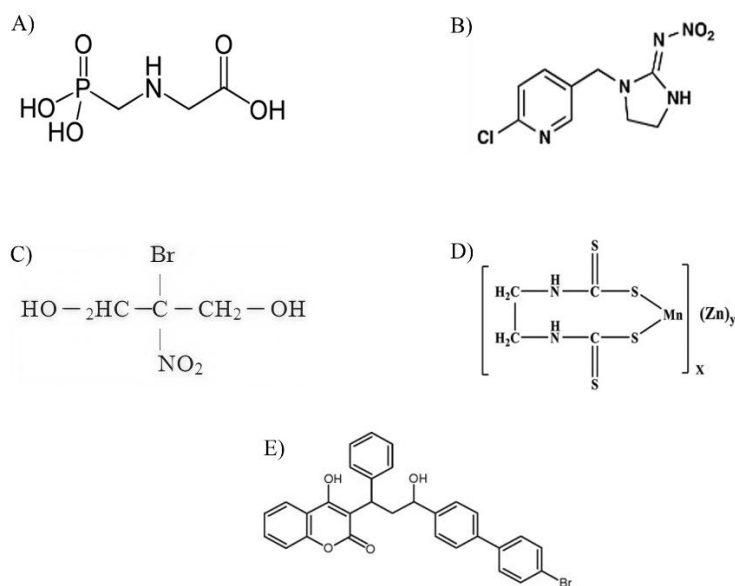


Fig. 1. Estructura química de distintos plaguicidas utilizados en la agricultura. A) Herbicida: Glifosato (Soares *et al.*, 2021); B) Insecticida: Imidacloprid (Araújo *et al.*, 2023); C) Bactericida: Bronopol (Ansari *et al.*, 2013); D) Fungicida: Mancozeb (Patil *et al.*, 2022); y E) Raticida: Brodifacoum (Sridhar *et al.*, 2015).

Aunque estos químicos han sido históricamente una estrategia necesaria para proteger semillas y salvaguardar los cultivos de hierbas, insectos, bacterias, hongos y roedores indeseables, también se han asociado con efectos negativos al afectar la salud ambiental y de distintos organismos (FAO, 2023; Arce-Estrada *et al.*, 2025).

Al ingresar en los sistemas productivos, los plaguicidas entran en contacto con múltiples componentes ambientales. Cuando son asperjados y alcanzan el suelo, pueden degradarlo progresivamente, y alterar la fertilidad a largo plazo, que reduce el rendimiento de los cultivos (Hossain *et al.*, 2022). Por otra parte, pueden dañar a los microorganismos benéficos del suelo, esenciales en el reciclaje de nutrientes y la salud edáfica (Malik *et al.*, 2017). Adicionalmente, estos compuestos pueden tener una persistencia en el suelo por periodos extendidos y su presencia lleva a la contaminación a largo término al daño potencial a cultivos futuros (Mandal *et al.*, 2020).

Los cuerpos de agua también se pueden afectar por estos químicos, ya que al ser lixiviados y llegar a aguas subterráneas, son transportados a distintas distancias, contaminan agua potable y sistemas acuáticos en donde la exposición prolongada a estos agroquímicos puede tener consecuencias graves para la salud humana y de los organismos acuáticos (Kaur y Sinha, 2019).

Por otra parte, los plaguicidas al no tener un organismo objetivo específico, cuando son asperjados en un ecosistema, también disminuyen las poblaciones benéficas como las de los distintos insectos polinizadores, de forma que provocan desbalance del ecosistema y se reduce la productividad agrícola (Maggi y Chreil, 2023).

La falta de protección y de capacitación al momento de aplicar los agroquímicos en campo representa un riesgo mayor de envenenamiento o intoxicación para los agricultores que se exponen directamente a los productos. Entre los síntomas de envenenamiento agudo se puede presentar descamación o irritación en los ojos, hasta efectos más severos como náusea, vómito, diarrea, mareos y en casos extremos dificultad para respirar e incluso muerte (Anjaria y Vaghela, 2024).

Los residuos de los químicos empleados persisten en los productos cosechados y pueden ser absorbidos por las plantas, lo que expone a los consumidores finales a una ingesta involuntaria. El consumo prolongado puede provocar un daño potencial a la salud (Anjaria y Vaghela, 2024), entre los efectos que se presentan están los desórdenes neurológicos como el déficit cognitivo y motor, particularmente en niños (Anaduaka *et al.*, 2023). La exposición prolongada incrementa el riesgo de padecer cáncer (Rossetti *et al.*, 2020), y también se han reportado problemas reproductivos como la reducción de fertilidad y problemas en el desarrollo en niños (Said, 2023).

Adicionalmente, el uso prolongado e indiscriminado de los plaguicidas provoca el desarrollo de resistencia en los distintos organismos plaga. Con el tiempo, se necesitará dosis en mayores concentraciones de diferentes químicos para lograr el mismo nivel de control. Esta dinámica incrementará el impacto ambiental (Anjaria y Vaghela, 2024).

### **2.2.2. Fungicidas**

Entre los distintos plaguicidas que se utilizan para contrarrestar el efecto de los agentes patógenos se encuentran los fungicidas, estos se consideran esenciales para prevenir las infestaciones en los cultivos (Zubrod *et al.*, 2019). Los antifúngicos han sido usados para afectar en lo positivo a la agricultura desde 1940. Sin embargo, la creación de nuevos formulados es un elemento fundamental para controlar las mayores plagas agrícolas. Debido a factores como el manejo de resistencia, los obstáculos regulatorios que sufren los actuales agroquímicos, así como el incremento de expectativa de los consumidores, se genera una constante necesidad de continuar con la formulación de estos compuestos (Leadbeater, 2015).

### **2.2.3. Tebuconazol**

Entre los distintos tipos de fungicidas que existen, los triazoles son un grupo que tiene un papel importante en la construcción de moléculas bioactivas en la agricultura. Estos pertenecen principalmente a los inhibidores de la desmetilación de esteroides (DMIs) (Cheng *et al.*, 2025). El Tebuconazol (Fig. 2) (TEB)

([(RS)-1-*p* chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1J-1, 2, 4-triazol-1-ylmethyl)-3-pentaol]), es un fungicida triazol considerado de amplio espectro para combatir enfermedades provocadas por basidiomicetos y ascomicetos en cereales, vegetales y frutas alrededor del mundo (Crofton, 1996; Navarro *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2016).

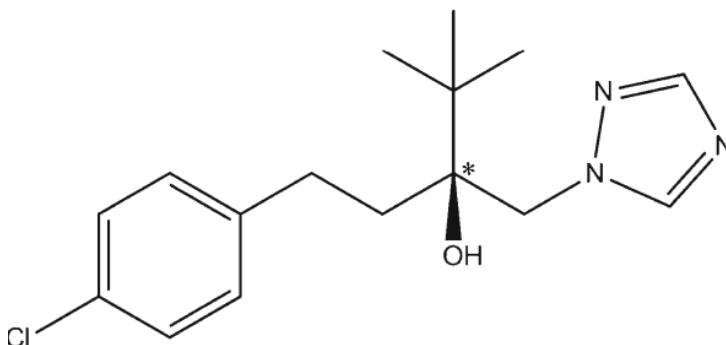


Fig. 2. Estructura química del Tebuconazol (Song y Nes, 2007; Zhang, 2017).

En general, el TEB es recomendado como un compuesto protector, curativo y que erradica las infecciones fúngicas en plantas (Klix *et al.*, 2007; Damicone, 2016). Actúa al unirse directamente al grupo hemo de la esterol 14 $\alpha$ -desmetilasa del sistema del citocromo P450 (CYP51), e interfiere con la biosíntesis del ergosterol (Yoshida y Aoyama, 1987), un compuesto presente en la membrana de la pared celular fúngica, por lo que se incrementa la permeabilidad de la membrana e inhibe con ello el crecimiento del hongo (Zhao *et al.*, 2022; Aragão *et al.*, 2021; Song y Nes, 2007).

Así como en la mayoría de los plaguicidas, los fungicidas tienen efectos dañinos para el ambiente y la salud humana resultado de la exposición de manera corta o crónica, consecuencia del contacto directo o transferencia ambiental. El TEB tiene una vida media en el ambiente de 49 a 610 días (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011), por lo que se facilita que se pueda tener contacto con el compuesto de manera directa o indirecta.

#### 2.2.4. Resistencia al Tebuconazol

En los hongos, como en todos los organismos, existe variación genética en las poblaciones, esta provee el punto de partida por el cual se genera la resistencia a fungicidas (Deising *et al.*, 2008). El proceso inicia cuando un organismo entra en contacto con un agente externo, como el TEB, se genera una presión selectiva que elimina a las colonias susceptibles, dando paso a la supervivencia de mutantes resistentes que subsecuentemente tendrán la oportunidad de crecer y reproducirse sin competencia (Deising *et al.*, 2008;

Lucas *et al.*, 2015). Estos procesos de selección promueven el desarrollo de ecotipos resistentes en presencia de un estresor (Fig. 3).

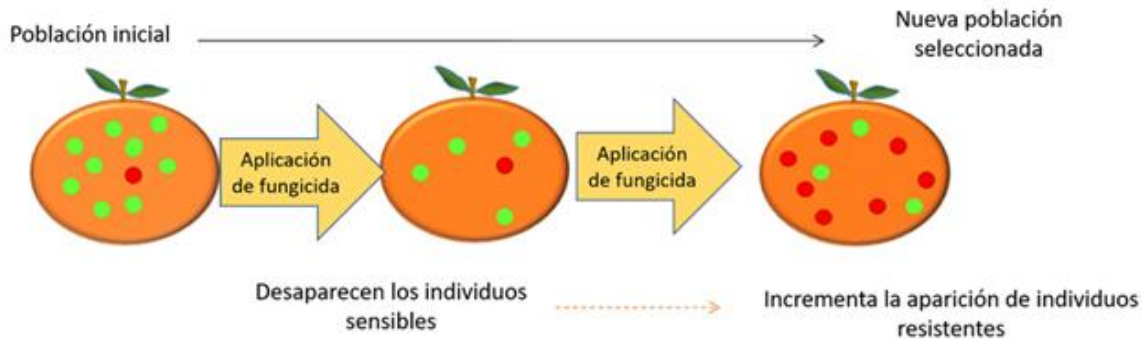


Fig. 3. Proceso de evolución de la resistencia a fungicidas, donde la población inicial presenta una alta susceptibilidad, después de la aplicación repetida de un agroquímico, la densidad poblacional cambia y presenta un aumento de organismos resistentes. Modificado de Sánchez-Torres (2021).

Aunque la presión selectiva ejercida por el fungicida favorece a las cepas adaptadas, se ha observado que estas tienen una menor aptitud que las susceptibles ya que requieren la presencia del estresor para sobrevivir. Sin embargo, se pueden presentar aislados con aptitud similar a los sensibles, con capacidad de permanecer por un mayor tiempo sin la aplicación del agroquímico (Lucas *et al.*, 2015).

Actualmente, el TEB es uno de los fungicidas más usados alrededor del mundo (Siek y Pazko, 2019). Sin embargo, existen distintas especies que han desarrollado resistencia a este agroquímico. Por ejemplo, se ha reportado este efecto en hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Malandrakis *et al.*, 2015), *Pyricularia* spp. (Dorigan *et al.*, 2017), *Monilinia fructicola* (Lichtemberg *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2019), y en el patógeno humano *Aspergillus fumigatus* (Cui *et al.*, 2019; Kemoi *et al.*, 2018; Jeanvoine *et al.*, 2020).

La pérdida de sensibilidad a los triazoles es una consecuencia de la modificación de prácticas agrícolas que favorecen la proliferación y desarrollo de nuevas cepas resistentes, así como su dispersión (Fones *et al.*, 2017). La aplicación intensiva y la constante presencia del fungicida, incluso en trazas, genera una presión selectiva en las poblaciones fúngicas, que conlleva a la modificación bioquímica en el sitio de acción del patógeno y provocando una disminución en la afinidad al compuesto (Sierotzki y Scalliet, 2013; Chen *et al.*, 2013). La resistencia a fungicidas se debe principalmente a cuatro mecanismos (Fig. 4), 1) la reducción en la afinidad al fungicida por la alteración en el sitio de acción; 2) la sobreexpresión de la proteína objetivo; 3) la reducción en la absorción del fungicida debido a las bombas de eflujo que remueven los compuestos

tóxicos; y 4) a la degradación metabólica del fungicida a través de la detoxificación (Sánchez-Torres, 2021; Lucas *et al.*, 2014).

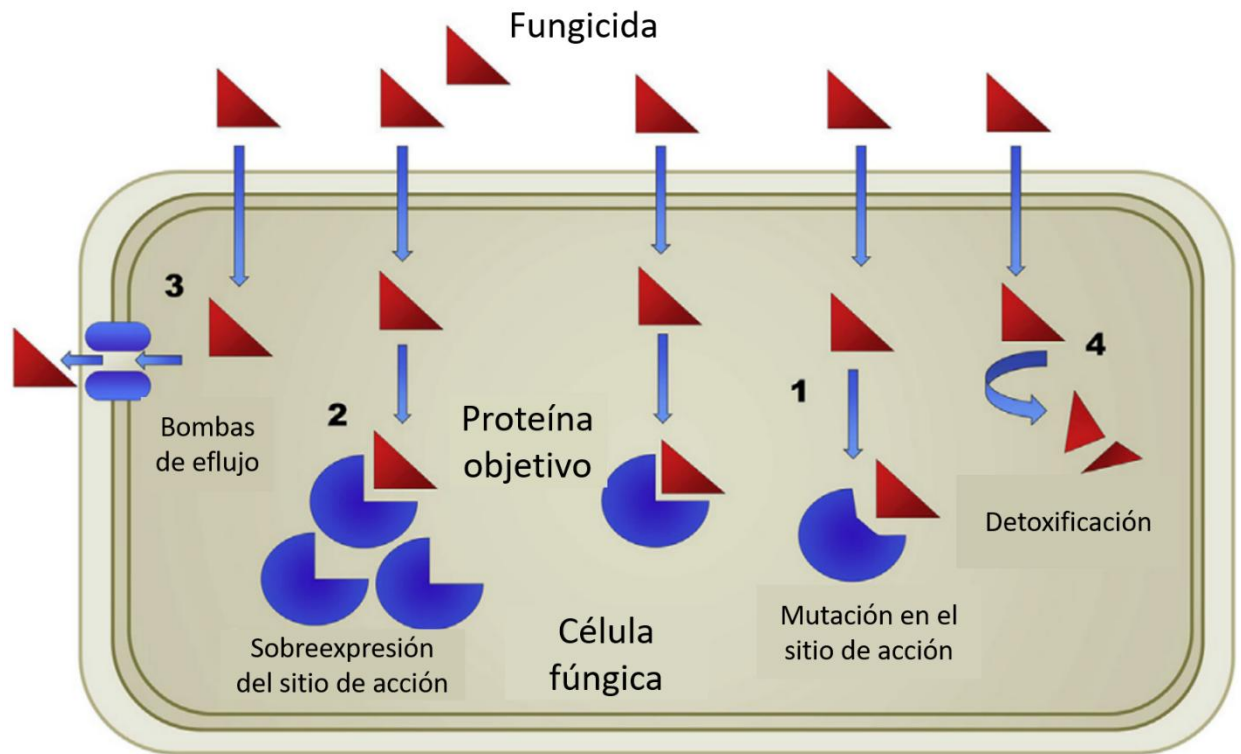


Fig. 4. Mecanismos de resistencia a fungicidas de un solo sitio de acción. Se observa en 1) Alteración de la proteína objetivo que previene la unión del fungicida (resistencia en el sitio objetivo); 2) Sobreexpresión de la proteína objetivo que obliga al incremento de la concentración del antifúngico necesario para inhibir el desarrollo; 3) Expulsión de fungicida del interior de la célula por bombas de eflujo; y 4) Degradación enzimática del fungicida. Modificado de Lucas *et al.* (2015).

### 2.3. Control biológico

Para disminuir el uso de agroquímicos y el efecto nocivo que generan, se han empleado estrategias como el control biológico que consiste en la utilización intencionada de organismos vivos nativos o introducidos, para mitigar el efecto adverso de las plagas al suprimir su actividad y disminuir la población de uno o más patógenos, de esta manera se reduce su número por debajo del nivel que causaría un daño económico (Stoner, 2004; Pal y McSpadden, 2006; Blackburn *et al.*, 2016). Entre los organismos que se emplean para el control biológico de plagas, se encuentran insectos depredadores y parasitoides, así como hongos, bacterias, nemátodos y virus entomopatógenos (Blackburn *et al.*, 2016).

### **2.3.1. Hongos entomopatógenos**

Entre los agentes de control biológico (ACB) más versátiles se encuentran los hongos entomopatógenos (HE), debido a su amplio rango de hospederos. Comprenden un grupo diverso superior a los 90 géneros con aproximadamente 750 especies entomopatógenas reportadas. La presencia de los HE ocurre en el ambiente de forma natural y son percibidos como organismos de menor riesgo ambiental. Por su modo de acción, se considera poco probable el desarrollo de resistencia a estos biocontroladores (Rai *et al.*, 2014).

### **2.3.2. Mecanismo de acción**

A diferencia de otros organismos patógenos de insectos, los hongos tienen habilidad para invadir por medio de penetración de la cutícula del hospedero, que está compuesta de fibrillas de quitina envueltas en una matriz de proteínas, lípidos, pigmentos y N-acilcatecolaminas (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013; Mannino *et al.*, 2019). Al ser depositados en un hospedero potencial, el propágulo fúngico inicia una serie de procesos para llevar a cabo la reacción de compatibilidad (infección) o incompatibilidad (resistencia). De forma alternativa, un propágulo que se adhiere en un insecto puede no provocar reacción debido a la ausencia de reconocimiento entre el hongo y el insecto (Castrillo *et al.*, 2005).

El proceso de infección implica interacciones complejas entre el insecto hospedero y el HE, estas respuestas varían entre hongos e incluso entre variedades de una sola especie. El primer paso en la infección, es la adhesión de los conidios o blastosporas a la cutícula del insecto (Fig. 5) (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Posteriormente se expresa una variedad de enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas y lipasas), y otros factores que promueven la germinación y desarrollo del hongo a través de la superficie del hospedero. Subsecuentemente se lleva a cabo la penetración en las capas de la cutícula por acción mecánica (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013).

Durante la penetración, el hongo produce estructuras de infección especializadas que pueden incluir clavijas de penetración y/o apresorios, que permiten el crecimiento de la hifa para introducirse en el integumento del hospedero, donde el hongo produce blastosporas o cuerpos hifales que son distribuidos pasivamente por la hemolinfa y cuerpos grasos (Mantzoukas *et al.*, 2022).

El tiempo en el que puede morir un insecto parasitado varía de 2 a 15 días después de la infección según la cepa fúngica y especie (Mantzoukas *et al.*, 2022). Posterior a la muerte del hospedero, el hongo regresa a su estado hifal y bajo condiciones óptimas de humedad relativa el entomopatógeno puede crecer en la superficie del cadáver para producir estructuras de reproducción (Castrillo *et al.*, 2005). Los cadáveres esporulados pueden infectar otros individuos de la misma especie objetivo a través de transmisión horizontal (Quesada-Moraga *et al.*, 2023; Vega *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha reportado la acción de algunos géneros fúngicos como hiperparásitos de hongos fitopatógenos, como se describe más adelante.

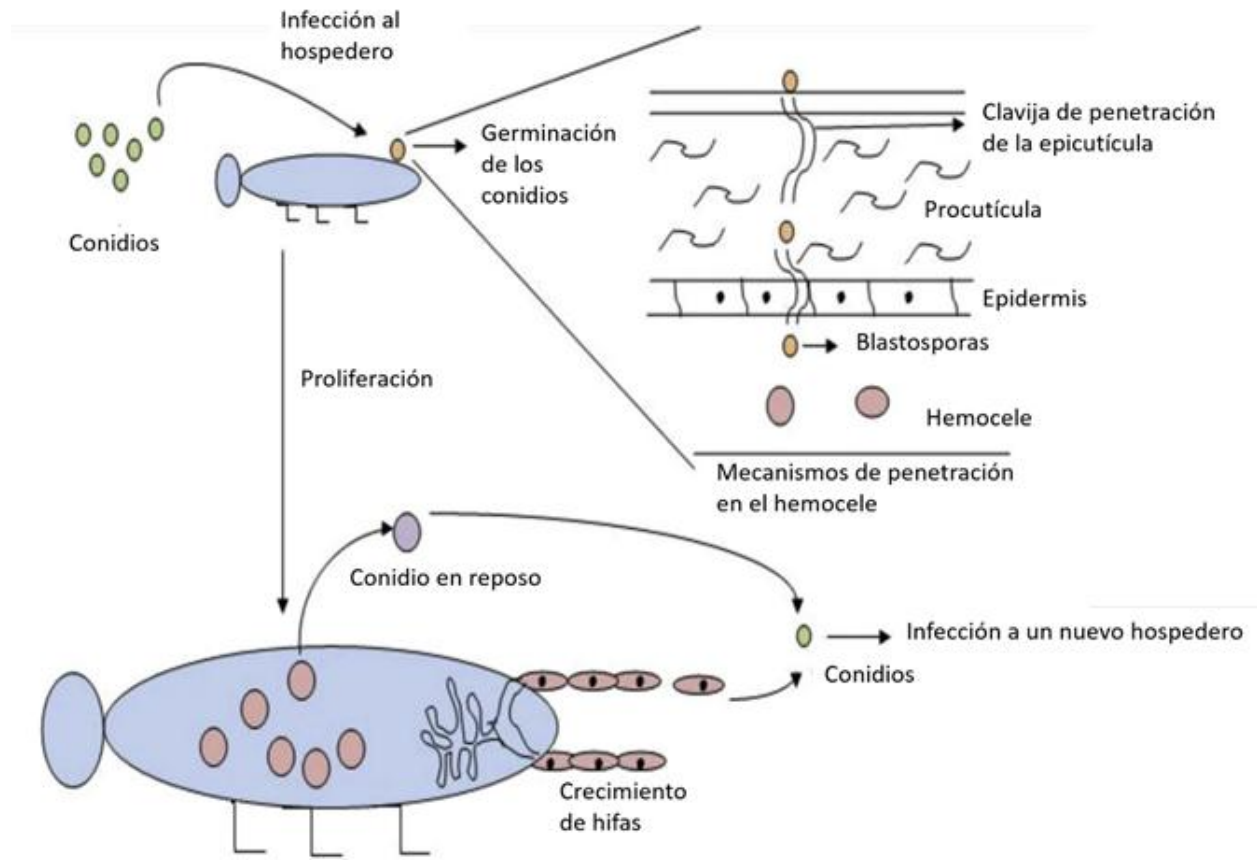


Fig. 5. Proceso de patogenicidad fúngica contra insectos. Modificado de Mondal *et al.* (2016).

### 2.3.3. Hongos micopatógenos

El micoparasitismo, conocido también como hiperparasitismo, se refiere a la acción parasitaria de un hongo sobre otro. El patógeno de este tipo se nombra hiperparásito, micoparásito o simplemente parásito (Barnett, 1963; Boosalis, 1964; Karlsson *et al.*, 2015). Esta relación depende del contacto entre el antagonista y el hospedero, la secreción de proteínas hidrolíticas y en el crecimiento activo del hiperparásito sobre el hospedero. Las enzimas de degradación de la pared como las quitinasas y  $\beta$ -glucanasas son comúnmente producidas por estos agentes (Asharf y Zuhaib, 2013).

Las interacciones micoparasitarias se pueden dividir en biotróficas y necrotróficas, de acuerdo con el modo de parasitismo y en el efecto sobre el hospedero (Boosalis, 1964; Asharf y Zuhaib, 2013; Moricca y Ragazzi, 2008). Los micoparásitos biotróficos obtienen sus nutrientes de células vivas del hospedero, sin causar signos evidentes de una enfermedad; sin embargo, la tasa de crecimiento, esporulación y metabolismo del hospedero se ven afectados en las etapas tempranas de la relación. Los hongos biotróficos forman

estructuras de infección especializadas o una interfaz parásito-hospedero, en estos parásitos no se ha demostrado una producción de toxinas extracelulares (Asharf y Zuhaib, 2013; Moricca y Ragazzi, 2008).

Por otra parte, los micoparásitos necrotróficos matan a su hospedero como resultado de la actividad parasitaria, la acción antagonista del parásito es altamente agresiva y el micoparásito domina la asociación. La hifa del parásito necrotrófico entra en contacto y crece incorporado al hospedero, algunas veces enrollándose alrededor de él y frecuentemente lo penetra. Este grupo secreta enzimas hidrolíticas o toxinas extracelulares que pueden causar la degradación del citoplasma antes de que las hifas del micoparásito entren en contacto, o de forma alterna ocurre hasta que se ha establecido contacto. Estos parásitos tienen un amplio espectro de hospederos, liberan toxinas y enzimas líticas al ambiente cercano al hongo, son demasiado destructivos y no suelen contar con estructuras de infección especializadas (Asharf y Zuhaib, 2013; Moricca y Ragazzi, 2008).

#### **2.3.4. *Akanthomyces lecanii***

Entre las distintas especies de ACB fúngicos se encuentra *Akanthomyces* (= *Lecanicillium*) *lecanii* (Kepler *et al.*, 2017). Se conoce como un hongo de halo blanco por la apariencia del micelio, se reproduce por conidios, los cuales son pequeños, hialinos, cilíndricos o elipsoidales y redondeados, las medidas varían de 2.3 a 10  $\mu$  de largo por 1 a 2.5  $\mu$  de ancho; estos conidios se encuentran en los extremos de conidióforos erectos, con fiálides colocadas de manera vertical (Zare y Games, 2003). Presenta un comportamiento necrotrófico en su acción como entomopatógeno y como micoparásito. Su acción como HE se ha observado en áfidos, aleuroridos, hemípteros y tisanópteros (Shinde *et al.*, 2010; Mier *et al.*, 1991; Amini *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2005; Goettel *et al.*, 2008). Además, se ha reportado en campo y laboratorio como micoparásito de hongos fitopatógenos como *Hemileia vastatrix* (Eskes *et al.*, 1991; Vendermeer *et al.*, 2009; Canjura-Saravia, 2002; González y Surís, 2007; Jackson *et al.*, 2012).

Para que los HE tengan éxito al implementarse estrategias de control de plagas, se debe considerar la supervivencia de los conidios en el ambiente (Benz, 1987). La presencia de residuos de fungicidas en los cultivos limita la efectividad de los ACB fúngicos, este efecto se ha reportado en distintas cepas de *A. lecanii* en presencia del TEB, que resulta altamente tóxico para el hongo. De manera que su aplicación como ACB se ve limitada en cultivos donde el agroquímico persiste (Reddy *et al.*, 2018; Behle y Brithsel, 2014; Ramakrishnan *et al.*, 2019; Castellanos-González *et al.*, 2012). Por lo tanto, su establecimiento, reproducción y acción parasitaria se ve comprometida.

#### **2.4. Estrategias para el mejoramiento de cepas**

Para la consideración de un HE como un potencial biocontrolador, este debe tener ciertas características básicas, como: alta virulencia contra el organismo objetivo, facilidad de producción masiva y resistencia a

condiciones ambientales extremas (Rangel *et al.*, 2015; Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). Además de estos rasgos, es necesario que el ACB pueda provocar una muerte rápida al patógeno, así como resultados similares comparados con los plaguicidas. La deficiencia en estas dos últimas acciones es en gran parte responsable de la falla en la adopción de biocontroladores (Vivekanandhan *et al.*, 2023).

El desarrollo de nuevos agentes de control biológico efectivos está ampliamente basado en la capacidad antagónica de los organismos candidatos contra los patógenos objetivo *in vitro*. Distintos mecanismos contribuyen a dicha capacidad, incluida la actividad de degradación de pared celular por enzimas, secreción de antimicrobianos como metabolitos secundarios, vigor de crecimiento y resistencia a toxinas endógenas y exógenas (Mondal *et al.*, 2016), por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar la efectividad de los ACB en campo.

#### **2.4.1. Ingeniería genética**

El uso de técnicas de DNA recombinante ha hecho posible mejorar significativamente la eficiencia de virus, bacterias y hongos como ACB (Inceoglu *et al.*, 2006, Wang y St. Leger, 2007). Estos avances se han logrado al combinar conocimiento nuevo de estudios básicos de biología molecular y genómica de estos patógenos con el desarrollo técnico que permite un incremento en la expresión génica y el uso de genes de otros organismos que codifican proteínas insecticidas para mejorar la eficacia de los biocontroladores (St. Leger y Wang, 2010).

En los hongos, los genes candidatos para el mejoramiento genético incluyen aquellos que codifican enzimas degradadoras de la cutícula y aquellos que por genes individuales codifican toxinas como la bassiacridina o la proteasa *Pr1*, ya que son fáciles de manipular mediante transferencia génica (St. Leger y Wang, 2010). El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* es un ejemplo de los organismos que puede ser mejorado por recombinación genética para mejorar su virulencia, por ejemplo, trabajos pioneros sobreexpresaron la proteasa *Pr1*, involucrada en la degradación de la cutícula de los insectos, mediante la inserción en el genoma del hongo de copias adicionales del gen *Pr1* junto con un promotor constitutivo (St. Leger *et al.*, 1996).

En la cepa ARSEF 549 de *M. anisopliae* se expresó la toxina de escorpión AaIT, esta se seleccionó para probar el efecto específico sobre insectos por ser una toxina bien estudiada y muy potente con la cual se puede prever un punto de referencia para eficacia (Zoltkin *et al.*, 2000). El entomopatógeno modificado logró la misma tasa de mortalidad en el gusano de tabaco con una dosis 22 veces menor de conidios y tiempos de sobrevivencia hasta 40 % menores en comparación con la cepa silvestre (Wang y St. Leger, 2007).

Por otra parte, en *B. bassiana* se realizó la integración en su genoma de múltiples copias del gen *Chit1* de origen endógeno, que codifica la expresión constitutiva de la quitinasa involucrada en la degradación de la cutícula de insectos. A partir de un análisis genómico, se observó que dos mutantes altamente virulentos sobreexpresaron el gen *Chit1* con 4 y 2 copias del gen en su genoma, designados <sup>E</sup>*BbChit1-3* and <sup>OE</sup>*BbChit1-5*. Estas mutantes mostraron una reducción en un 75.7 % en el tiempo letal (LT<sub>50</sub>), en comparación con la cepa silvestre (Mascarin *et al.*, 2025).

De igual forma, para mejorar la virulencia en *B. bassiana*, se ha empleado el sistema de ribonucleoproteínas CRISPR-Cas9 para modificar el gen *Bbsmr1* que codifica para un factor de transcripción, que conduce a la desrepresión del clúster de genes biosintéticos de oosporeina, que resultó en una sobreproducción de una dibenzoquinona involucrada en la evasión inmune del hospedero y así, en un aumento de la virulencia fúngica, con una reducción en los tiempos y concentraciones letales en comparación con la cepa silvestre. Además de exhibir una germinación más rápida sobre la cutícula del insecto (Mascarin *et al.*, 2024).

#### **2.4.2. Mutación por radiación UV**

Existen varias fuentes de mutación tradicional, entre ellas la utilización de mutágenos físicos, como la radiación UV (Rachmayati *et al.*, 2020). Este método es uno de los más efectivos para mejorar cepas por su fuerte efecto genotóxico para producir daño en el ADN e inducir mutaciones (Hammok y Al-rawi, 2021). La radiación ultravioleta se clasifica en tres categorías de acuerdo con la longitud de onda: UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) y UV-C (<290 nm), esta última cubre la máxima absorción del ADN, por lo que actúa como el mutágeno más potente (Suthaparan *et al.*, 2018).

La radiación ultravioleta es conocida por inducir mutaciones aleatorias en distintos organismos (Arora *et al.*, 2020), debido al daño producido en el ADN por mecanismos directos e indirectos. El mecanismo directo que afecta dos pirimidinas adyacentes (timinas o citosinas), donde se forma un anillo de ciclobutano que une dos pirimidinas (dímeros de pirimidinas ciclobutano [CPDs]). Por otra parte, el mecanismo indirecto conduce a mutaciones oxidativas a través de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden atacar el ADN y provocar daño oxidativo. Ambos modelos se han propuesto para generar mutaciones inducidas por radiación ultravioleta durante la replicación de ADN (Ikehata y Ono, 2011).

##### **2.4.2.1. Casos favorables de mutagénesis por radiación UV-C**

Se ha reportado el efecto negativo de la radiación UV-A y la incidencia del espectro UV-B en distintos hongos como *Metarhizium anisopliae* (Rangel *et al.*, 2004), *Beauveria bassiana* (Sun *et al.*, 2023), *Lecanicillium* spp. (Galvão y Bettioli, 2014), al reducir la viabilidad de conidios, así como la actividad germicida de la radiación UV-C (Braga *et al.*, 2015). Aun así, se han realizado diversas investigaciones en las que se logró obtener nuevos linajes con características deseadas para ser utilizadas en lugares con

condiciones desfavorables. Para ello es importante determinar la magnitud de la exposición a radiación UV (tiempo y distancia de la fuente de radiación). En general, se ha reportado que una dosis de radiación que cause entre el 60 y 70 % de mortalidad en los conidios puede producir resultados favorables (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009; Boss, 1987). Robledo-Monterrubio *et al.* (2009), Obtuvieron por radiación UV mutantes a partir de una variedad silvestre de *Beauveria bassiana* 88 (Bb88), al exponer suspensiones de conidios a una lámpara UV (254 nm) a una distancia de 15 cm durante distintos periodos (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 9, 12, 15, 18, and 20 min). Se caracterizaron cinco mutantes en Agar Dextrosa Sabouraud y Agar Quitina para la obtención de la tasa de extensión radial ( $V_r$ ) y tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ). Adicionalmente se analizó el índice de potencia de producción de proteasas y lipasas, niveles de producción de conidios, tamaño y viabilidad de los mismos. Los valores más altos para las medidas fisiológicas se obtuvieron para la cepa mutante 882.5, que en relación a Bb88, que mostró 30 % de reducción en Tiempo Letal ( $TL_{50}$ ) en *Sphenarium purpurascens*, 70 % en *Acheta domesticus*, y 71 % en larvas y adultos de *Tenebrio monitor*. La Concentración Letal ( $CL_{50}$ ) en larvas de *T. molitor* fue  $2.8 \times 10^5$  conidios/ml, y  $1.5 \times 10^6$  conidios/ml, respectivamente para la cepa mutante y silvestre. Lo que demostró una mayor virulencia del aislado mutante con más del 80 % de reducción en  $CL_{50}$ .

En el HE *M. anisopliae*, Gao *et al.* (2025), indujeron mutaciones en la cepa Ma83 mediante radiación UV-B para mejorar la resistencia del hongo al estrés abiótico y caracterizaron el fenotipo de las cepas mutantes, donde se incluyó la morfología colonial, tasa de crecimiento, producción de conidios, tolerancia a estrés y virulencia; además, se realizó un análisis transcriptómico para revelar los mecanismos subyacentes a cada fenotipo. Entre las mutantes generadas, MaUV-22 mostró una mejor tolerancia al estrés por calor con crecimiento a 45 °C, al estrés oxidativo, estrés osmótico y al estrés de interferencia de la pared celular. Así como un incremento en la virulencia contra *Galleria mellonella*. El análisis de transcriptoma reveló que la expresión de genes asociados con la vía de las proteínas de choque térmico, glutatión S-transferasa y la tioredoxina reductasa aumentó drásticamente, mientras que la expresión de los genes relacionados con las vías de la catalasa y la superóxido dismutasa disminuyó.

Además de utilizar la radiación UV para aumentar la virulencia de hongos entomopatógenos, se ha empleado para poder desarrollar características que les permitan a estos organismos adaptarse mejor a las condiciones que se presentan en campo, como son los agroquímicos que se agregan en los cultivos. Xie *et al.* (2018), expusieron conidios de *L. lecanii* a multiplex rondas de radiación UV-C y posteriormente al fungicida propamocarb en concentraciones crecientes. Se seleccionó la mutante U-60-C1M y posterior a seis rondas de irradiación, se obtuvo una mutante con mayor tolerancia al fungicida en la que su concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) incremento 2.15 veces comparado a la cepa silvestre. Esta mutante no mostró ningún cambio significativo en germinación de conidios, ni virulencia en áfidos. Sin embargo, su

crecimiento colonial fue significativamente menor que el de la cepa silvestre. El resultado indica que esta cepa mejorada puede tener un uso potencial al ser aplicada en combinación con propamocarb en campo.

Por otra parte, los ACB fúngicos pueden verse afectados por los demás organismos presentes en el ambiente donde se pretenden emplear, Marzano *et al.* (2013), reportaron la inhibición del crecimiento de *Trichoderma harzianum* (Th908) en presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Fo2797) debido a la secreción de ácido fusárico (AF). Para obtener mutantes con mayor tolerancia al AF, irradiaron conidios de la cepa Th908 a luz UV-C, seleccionaron mutantes capaces de crecer en PDA adicionado con extractos de la cepa Fo2797 o con AF, seleccionaron una mutante tolerante y estable sin alteraciones fisiológicas, Th908-5. Al evaluar la capacidad de la mutante Th908-5 y la cepa silvestre Th908 para reducir el efecto de *F. oxysporum*, se observó una disminución significativa del agente patógeno por parte de la cepa mutante.

### **2.4.3. Presión selectiva**

La aplicación de organismos genéticamente modificados (OGM) se suele asociar a problemas regulatorios y sociales, lo cual limita su implementación (Koenraadt y Takken, 2011). No obstante, el interés en la manipulación genética para optimizar el rendimiento de hongos de relevancia industrial, se centra en los métodos tradicionales de ingeniería genética que suelen ser caros, lentos y laboriosos. Por otra parte, las mutaciones dirigidas, simples o múltiples con frecuencia fallan en producir los resultados deseados, y aunque existen métodos con mayor rendimiento, como la prospección genética (Salazar-Cerezo *et al.*, 2023), estos aún son limitados por el hecho de que muchos fenotipos favorables como la tolerancia prolongada, a menudo requieren cambios distribuidos en muchas partes del genoma (Rihele *et al.*, 2003; Cobb *et al.*, 2013).

Evitar la modificación genética y el uso de OGM es factible mediante la exploración de los recursos biológicos, aunado a técnicas que permitan la alteración de sus fenotipos sin ingeniería genética. La evolución experimental es un método para hacer esto, ya que combina la habilidad para monitorear y replicar simultáneamente poblaciones con la facultad de variar parámetros individuales para probar hipótesis evolutivas específicas, algo que suele ser impráctico en poblaciones naturales (Fisher y Lang, 2016). La utilización de cultivos continuos y quimiostatos se ha considerado como único método práctico para lograr estas alteraciones y realizar una selección de variantes genéticas que puedan adaptarse a cambios graduales en condiciones ambientales, donde se aprovecha el poder evolutivo por selección natural (Witten *et al.*, 2007), pero la propia naturaleza de los hongos y la manera en que crecen hacen que estos no sean una opción idónea (Kohn *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2004).

#### 2.4.3.1. Casos favorables de presión selectiva

Un caso particular de presión selectiva se ha observado en la resistencia a antibióticos en distintas bacterias de importancia médica, provocada por la rápida evolución del genoma bacteriano (Kolář *et al.*, 2001; Brepoels *et al.*, 2024). Para poder estudiar la evolución y migración a través de un espacio con condiciones desafiantes, Baym *et al.* (2016), desarrollaron un dispositivo nombrado Arena de Crecimiento y Evolución Microbiana (MEGA) de 120 cm de largo × 60 cm de ancho y 11 mm de alto, que permite la observación e identificación de linajes mutantes con resistencia a concentraciones crecientes de un antimicrobiano. Para llevar a cabo el estudio, colocaron en la placa MEGA distintas secciones con gradientes de antibiótico con incrementos de un orden de magnitud en la concentración de 0, 3, 30, 300 y 3000 veces la concentración mínima inhibitoria (CIM) de trimetoprima; y 0, 20, 200, 2000 y 20,000 la CIM de ciprofloxacino. Las regiones de la caja MEGA sin antibiótico se inocularon con una cepa silvestre de *Escherichia coli*. De esta forma, observaron la colonización de la población inicial en el espacio sin antibiótico y posteriormente, al verse agotado los recursos se evidenció la aparición de mutantes resistentes que migraron a las regiones con presencia del fármaco, hasta colonizar las zonas con mayores concentraciones de trimetoprima o ciprofloxacino. La placa MEGA mostró ser una herramienta que provee una plataforma versátil para el estudio de adaptación microbiana y visualización directa de dinámicas evolutivas ante un estresor que provoca presión selectiva en un organismo.

Por otra parte, los hongos ocupan un nicho único, son un recurso particularmente amplio y valioso para entender procesos evolutivos experimentales (Fisher y Lang, 20016). Debido a esto, se han propuesto diferentes esquemas de presión selectiva. Valero-Jiménez *et al.* (2016), emplearon mosquitos de malaria (*Anopheles coluzzii*) para evaluar la virulencia, extensión de micelio fúngico, tasa de crecimiento micelial y tasa de conidiación de dos aislados de *B. bassiana* (Bb1520 y Bb8020). Las cepas se sometieron a diez ciclos de selección, a través de procesos de reinfección de *A. coluzzii*, donde se observó la evolución alterna de linajes de *B. bassiana* sin una alteración significativa del crecimiento micelial y fueron capaces de mantener la habilidad de matar al insecto. El resultado sugiere que el crecimiento fúngico y conidiación evolucionaron a través del uso exclusivo y sucesivo de un insecto hospedero como fuente de nutrientes.

Para mejorar la resistencia a fungicidas en *B. bassiana*, Shapiro-Ilan *et al.* (2002), determinaron la variación en la resistencia natural del entomopatógeno a antimicóticos, seguido de un intento de incrementar la resistencia del hongo a través de selección artificial, manteniendo la estabilidad en la virulencia del hongo. La variación natural se probó con siete cepas, donde estandarizaron las cantidades de los fungicidas dodine (0, 1, 10, 100, 200, y 500 µg/ml), fenbuconazol (0, 0.05, 1, 5, 0 y 20 µg/ml) e hidróxido de trifenilestaño (0, 0.05, 0.5, 1, 5 y 10 µg/ml) en Agar Dextrosa Sabouraud con extracto de levadura (SDAY). De la primera etapa experimental se seleccionaron dos cepas de *B. bassiana*, GHA (comercial) y MIX (originada de una

combinación de conidios derivados de cuatro insectos adultos de *Curculio caryae*). Las cepas GHA y MIX pasaron por un proceso de selección artificial, con siete subcultivos de GHA con 10, 1 y 1  $\mu\text{g/ml}$  de dodine, fenbuconazol e hidróxido de trifenilestaño, respectivamente; y de MIX con 200, 20 y 5  $\mu\text{g/ml}$  de dodine, fenbuconazol e hidróxido de trifenilestaño, respectivamente. Después se realizaron dos grupos, uno que se sometió a tres subcultivos con fungicida adicionado y otro sin fungicida, para comprobar la estabilidad en la tolerancia a los fungicidas. Por último, se evaluó la virulencia por medio de bioensayos con larvas de *C. caryae* en cuarto estadio. La selección artificial resultó en un incremento en la resistencia a fungicidas en la cepa GHA, pero no en MIX. Al remover la presión selectiva por tres resiembras se mantuvo la estabilidad en la resistencia. Además, subcultivar con exposición a fungicidas no afectó la virulencia de GHA en *C. caryae*, y se notó un incremento para la cepa MIX.

### 3. Justificación

A nivel global, la producción agrícola es un desafío constante debido a las pérdidas ocasionadas por la presencia de plagas y enfermedades vegetales, estimadas entre el 20 y 40 % de la producción mundial, con un impacto económico de más de 220 mil millones de dólares anuales (FAO, 2022). Entre los distintos agentes fitopatógenos se encuentran los hongos, que llegan a afectar hasta el 80 % de los cultivos (Jankielsohn, 2018). Adicionalmente, el cambio climático y las prácticas agrícolas intensivas incrementan el riesgo de aparición y dispersión de nuevas cepas patógenas, situación que aumenta la presión sobre los sistemas productivos (Singh *et al.*, 2023).

Para combatir a los distintos organismos fitopatógenos, como los hongos, se usan estrategias como el control químico, donde el uso de fungicidas es la opción predominante. El TEB, es un antifúngico triazol de amplio espectro, que ha sido empleado con gran eficiencia por su modo de acción al inhibir la biosíntesis del ergosterol (Yoshida y Aoyama, 1987; Zhao *et al.*, 2022). Sin embargo, su uso intensivo ha generado una presión selectiva en distintas especies, que ha derivado en su resistencia al fungicida. Además, la constante utilización de estos productos representa un riesgo ambiental por su alta persistencia en suelos, con una vida media de hasta 610 días (Muños-Leoz *et al.*, 2011), contaminación de cuerpos de agua y exposición de diferentes organismos que entran en contacto con ellos (Kaur y Sinha, 2019), además de que el contacto directo o el consumo indirecto de los fungicidas tienen efectos graves en la salud humana (Anjaria y Vaghela, 2024).

El control biológico es una alternativa que permite reducir los riesgos ambientales y a la salud asociados al uso de plaguicidas químicos. En esta estrategia se emplean distintos organismos para el control de hongos fitopatógenos. Un ejemplo de estos es el hongo *Akanthomyces lecanii*, que tiene un amplio espectro de hospederos, es capaz de establecerse de forma natural en el ambiente y tiene un bajo riesgo de generar resistencia en los organismos plaga (Rai *et al.*, 2014). Sin embargo, su efectividad en campo se puede limitar por la presencia de residuos de plaguicidas como el TEB, el cual se ha reportado como altamente tóxico para distintas cepas de *A. lecanii* y limita su acción entomopatógena y micoparasítica (Reddy *et al.*, 2018; Castellanos-González *et al.*, 2012).

Aunque los ACB fúngicos representan una alternativa que no provoca un efecto adverso al ambiente, su eficacia puede verse limitada debido a los tiempos de acción más prolongados en comparación con los plaguicidas químicos. Debido a esto, se han planteado alternativas como la ingeniería genética para mejorar su efectividad y establecimiento en campo. Sin embargo, existen limitaciones debido a problemáticas sociales y regulatorias que complican su implementación. En México, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) (H. Congreso de la Unión, 2022) establece los lineamientos para su uso. Aunque, el artículo 6 de esta ley excluye de su aplicación a los organismos

obtenidos mediante técnicas tradicionales de mutagénesis o fusión celular, siempre que los organismos resultantes puedan propagarse a través de métodos convencionales o de multiplicación por cultivos *in vitro* o *in vivo* y que no involucren OGMs como receptores o parentales.

De esta forma, la mutagénesis inducida por radiación ultravioleta se ha considerado como una alternativa viable para generar mutantes con características deseables, como la resistencia a plaguicidas, como se ha observado en *A. lecanii* (Xie *et al.* 2018). Adicionalmente, la implementación de estrategias que ejerzan una presión selectiva puede mejorar las probabilidades de obtener variantes resistentes y adaptadas a condiciones estresantes, en las que se mantiene e incluso se incrementa la virulencia. Este tipo de estrategias puede favorecer la generación de cepas mejor adaptadas a las condiciones a las que se aplicarán en campo para el control biológico de agentes fitopatógenos.

#### **4. Hipótesis**

La inducción de mutagénesis por radiación UV, combinada con presión selectiva mediante concentraciones crecientes de TEB, permite obtener cepas mutantes estables de *Akanthomyces lecanii* resistentes al fungicida sin comprometer su virulencia.

## **5. Objetivos**

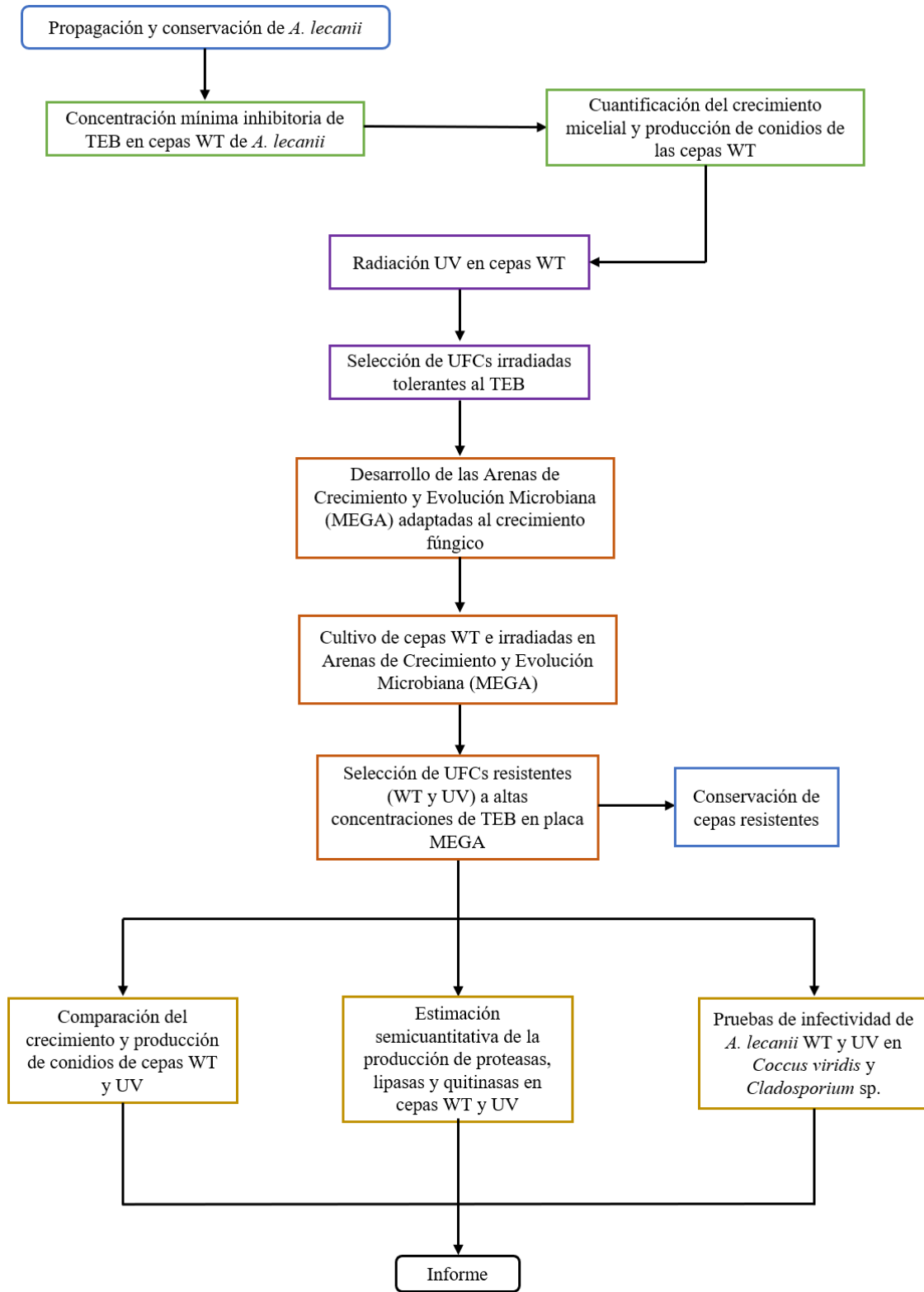
### **5.1. Objetivo general**

Obtener cepas mutantes del hongo entomopatógeno y micoparásito *A. lecanii* resistentes a concentraciones elevadas del fungicida TEB, sin comprometer su virulencia.

### **5.2. Objetivos particulares**

- Determinar la concentración mínima inhibitoria al TEB en las cepas silvestres (WT) de *A. lecanii*.
- Obtener cepas fúngicas mutantes a través de radiación UV-C.
- Desarrollar las Arenas de Crecimiento y Evolución Microbiana adaptadas al crecimiento fúngico.
- Seleccionar cepas resistentes a altas concentraciones de TEB por presión selectiva.
- Determinar la tasa de crecimiento micelial y tasa de conidiación de cepas WT y resistentes a TEB.
- Evaluar de forma semicuantitativa la producción de proteasas, quitinasas y lipasas en cepas WT y resistentes a TEB.
- Comparar la virulencia entre cepas WT y resistentes a TEB con el insecto *Coccus viridis* y el hongo *Cladosporium* sp.

## 6. Diagrama metodológico



## **7. Metodología**

### **7.1. Material biológico**

Se seleccionaron dos cepas silvestres (WT) del hongo *A. lecanii* nativas de México; EH-348/2 proveniente del estado de Morelos; y EH-459 aislada del Estado de México. Ambas se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Micología del Departamento El Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Las cepas se cultivaron en medio Agar Papa Dextrosa con 1 g/l de extracto de levadura (PDAY) e incubadas a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , con fotoperiodo 12:12 por 7 días. Posteriormente, se colectaron los conidios con 10 ml de agua destilada con Tween 80 (0.05 %) y se filtró con gasa para evitar la presencia de micelio. Las suspensiones de conidios se ajustaron a  $1 \times 10^6$  conidios por mililitro (con/ml) y se utilizaron en los siguientes experimentos.

Por otra parte, se realizaron cultivos inclinados con medio PDAY para mantener en refrigeración y contar con material biológico suficiente para los procesos experimentales. Adicionalmente, se realizaron cultivos en criotubos, en las mismas condiciones, al paso de 7 días de incubación, se les agregó aceite mineral hasta cubrir el cultivo, esta técnica es utilizada para preservar distintas especies de HE (Mier *et al.*, 2005).

### **7.2. Concentración mínima inhibitoria de TEB en *A. lecanii***

Para evaluar la susceptibilidad de las cepas de *A. lecanii* al TEB, se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados en medio de cultivo PDAY, el mismo fue utilizado como referencia de crecimiento y conidiación. Por otra parte, se empleó el medio mínimo (MM) de Hagedus y Khachatourians (MM: 3.1 g/l  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 g/l  $\text{KHPO}_4$ , 0.5 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 ml de solución de elementos traza por litro (0.05 g  $\text{FeCl}_2$ , 0.04 g  $\text{ZnSO}_4$ , 0.03 g  $\text{MgSO}_4$  en 100 ml de agua destilada), y 2 % de agar) (Hagedus y Khachatourians, 1995), con manitol como fuente de carbono en una concentración de 20 g/l. Adicionalmente, los mismos medios de cultivo fueron preparados con TEB (Folicur, Bayer) (PDAY-TEB y MM-TEB), en las concentraciones 0.01 mg/l, 0.02 mg/l, 0.05 mg/l, 1.43 mg/l, 2.87 mg/l, 4.31 mg/l y 5.75mg/l que corresponde a la dosis recomendada por el proveedor para la aplicación en campo.

El cultivo de las cepas en cajas de Petri con los medios de cultivo (PDAY y MM) simples y adicionados con el fungicida para determinar el crecimiento radial, se realizó con la extracción de una fracción de 0.5 mm de diámetro del medio en el centro de las cajas, se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de suspensión de conidios ajustada a  $1 \times 10^6$  con/ml. El desarrollo vegetativo se registró por siete días, y se calculó con regresión lineal de acuerdo con Safavi *et al.* (2007). La cuantificación de conidios se realizó con los mismos medios de cultivo, al sembrar en césped una alícuota de la suspensión de conidios en el centro de las cajas de Petri y extendiendo por toda la superficie con ayuda de un rastrillo. Posterior al tiempo de incubación de siete días,

se extrajo 1 cm<sup>2</sup> de cada cepa, se colocó cada uno en tubos Falcon con agua destilada y Tween 80 al 0.05 %; se pasaron por vórtex durante un minuto y se tomó una muestra de 10 µl para hacer los conteos en cámara Neubauer, cada experimento se realizó por triplicado.

### **7.3. Mutagénesis por radiación UV-C**

Para inducir mutación en las cepas EH-348/2 y EH-459 de *A. lecanii*, se irradió con una lámpara UV-C con emisión a 254 nm (350 µW/cm<sup>2</sup>) a una distancia de 15 cm (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009), con diferentes periodos de exposición (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 160 s) (Xiet *et al.*, 2018).

Se colocaron por separado diez mililitros de cada suspensión de conidios cosechados mediante agua con Tween al 0.05 % en cajas de Petri de cristal con agitación suave y se irradiaron como se describió arriba. Posteriormente se tomaron 1000 µl de cada tiempo de exposición, se colocaron en tubos Eppendorf, se cubrieron con aluminio y se mantuvieron en hielo por 30 minutos para evitar el proceso de fotoreactivación. Posteriormente, se sembraron 10 µl en cajas Petri con medio PDAY. Las muestras se tomaron por triplicado, se cubrieron con aluminio e incubaron por cinco días a 27 °C.

Al paso del tiempo de incubación, se cuantificó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes en cada caja Petri, donde el 100 % de viabilidad correspondió al número de colonias que crecieron a partir de conidios no irradiados (Xie *et al.*, 2018). Los datos obtenidos se ajustaron de acuerdo con el modelo de decrecimiento exponencial de Miranda-Hernández *et al.* (2014); se seleccionó el tiempo de exposición que resultó en una tasa de mortalidad entre el 60 % y 70 %, ya que se ha reportado la generación de mutantes estables en este intervalo de sobrevivencia (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009; Boss, 1987).

Para generar mutantes resistentes a TEB por radiación UV, las cepas WT (EH-348/2WT y EH-459WT), se irradiaron por 88.8 y 39.4s, respectivamente. De esta manera, se obtuvo una mortalidad de 65 % de los conidios en cada aislado. Las muestras sometidas a radiación se sembraron en PDAY como testigo para confirmar la presencia de UFC y también en MM usando tres concentraciones de fungicida, 0.01 mg/l, 0.02 mg/l y 0.05 mg/l para asegurar el crecimiento en dosis mayores a la CMI, estas concentraciones fueron equivalentes al 0.25 %, 0.5 % y 1 % con relación a la dosis recomendada por el proveedor. Las cajas Petri se cubrieron con aluminio e incubaron por siete días a 27 °C, donde el crecimiento de colonias confirmó la generación de nuevos linajes resistentes al TEB.

Los conidios de las cepas irradiadas que crecieron en las tres concentraciones de TEB fueron recuperados con agua destilada y Tween 80 al 0.05 %, las muestras se cuantificaron en cámara Neubauer y se ajustaron las suspensiones a 1 × 10<sup>6</sup> con/ml, para ser usadas en las siguientes etapas experimentales. Por otra parte, una alícuota se sembró en MM adicionado con 0.05 mg/l TEB para obtener material biológico y preservarlo.

#### **7.4. Desarrollo de la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA)**

Como parte del proceso de presión selectiva, se utilizó un modelo modificado de la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano. Este instrumento permite someter a procesos de presión selectiva a una población microbiana abundante con un gradiente discontinuo de un inhibidor, favoreciendo la generación de variantes resistentes de los microorganismos evaluados y subsecuentemente la evolución de las cepas sembradas originalmente (Baym *et al.*, 2016).

El modelo de placa basado en el reportado por Baym *et al.* (2016) se construyó en policarbonato para poder ser esterilizado en autoclave. La placa MEGA incluye dos cajas rectangulares concéntricas; en la placa interior se coloca el medio de cultivo el cuál se puede dividir en secciones o etapas, cada una con medio de cultivo con concentraciones de TEB. La caja externa funciona como una cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio durante los periodos largos de incubación. La estructura rectangular interna tiene una longitud de 31 cm × 21.2 cm de ancho y 3.5 cm de alto. Internamente, esta estructura incluye tres separaciones con una serie de 8 espacios y placas de separación cada una, miden 2.5 cm de ancho y 7.5 cm de largo. La placa interna incluye cuatro bases de 1.5 cm de largo × 1.5 cm de ancho y 0.5 cm de alto para mantener una separación de la caja externa. La base rectangular interna se coloca dentro de la caja externa que mide 33.5 cm de largo × 23.7 cm de ancho y 5 cm de alto, y cuenta con una tapa de 34.7 cm de alto × 24.9 cm de ancho y 2.5 cm de alto (Fig. 6).

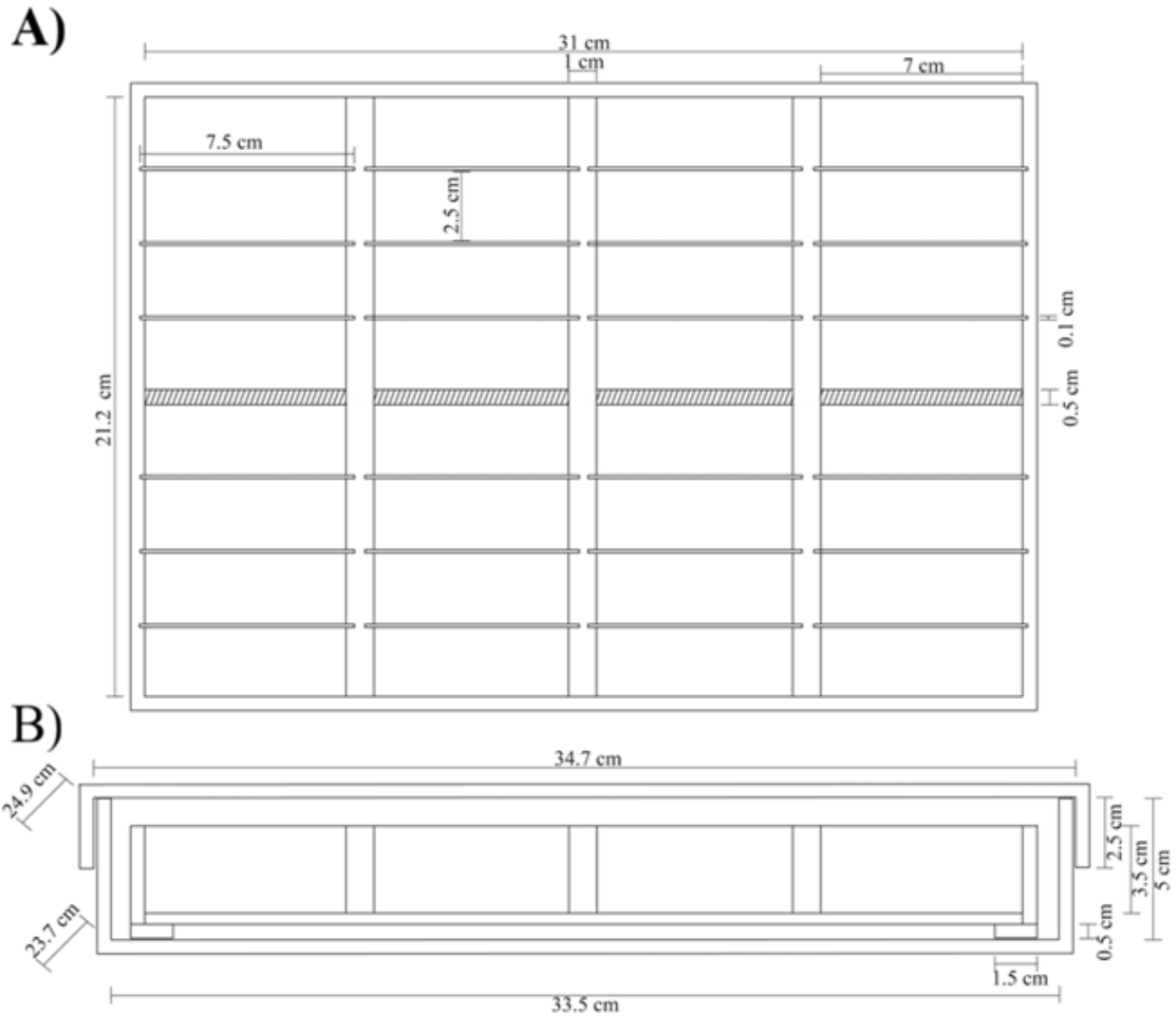


Fig. 6. Placa MEGA modificada de Baym et al. (2016), adaptada al crecimiento fúngico. A) corresponde a la vista superior de la placa, muestra las cuatro divisiones principales, cada una dividida en secciones que ayudan a formar el medio de cultivo con gradiente de fungicida; los conidios se inoculan en la sección central (señalado con el patrón de líneas diagonales). B) muestra la vista lateral de la caja con la placa interior; el alto de 0.5 cm provee un espacio para mantener un espejo de agua y prevenir la deshidratación del medio de cultivo durante periodos largos de incubación.

### 7.5. Cultivo en la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA)

Para realizar el cultivo en la placa MEGA, se elaboró el gradiente de TEB, primero se colocaron 360 ml de agar agua con 0.02 mg/l de TEB en la base para rellenar los espacios internos y también para ser la primera capa que inicie la selección con una dosis baja del fungicida en la región donde se coloca el inóculo. Posteriormente, cada sección se llenó con 5 ml de MM adicionado con TEB a 0.05 mg/l en la primera

sección, 0.57 mg/l, 5.75 mg/l y 57.50 mg/l en las siguientes (Fig. 7). De esta manera, cada espacio tuvo un incremento de 10 en la concentración del fungicida. Finalmente, en la caja externa se colocó un espejo de agua (150 ml) con 10 % de glicerol para evitar la deshidratación del medio de cultivo.

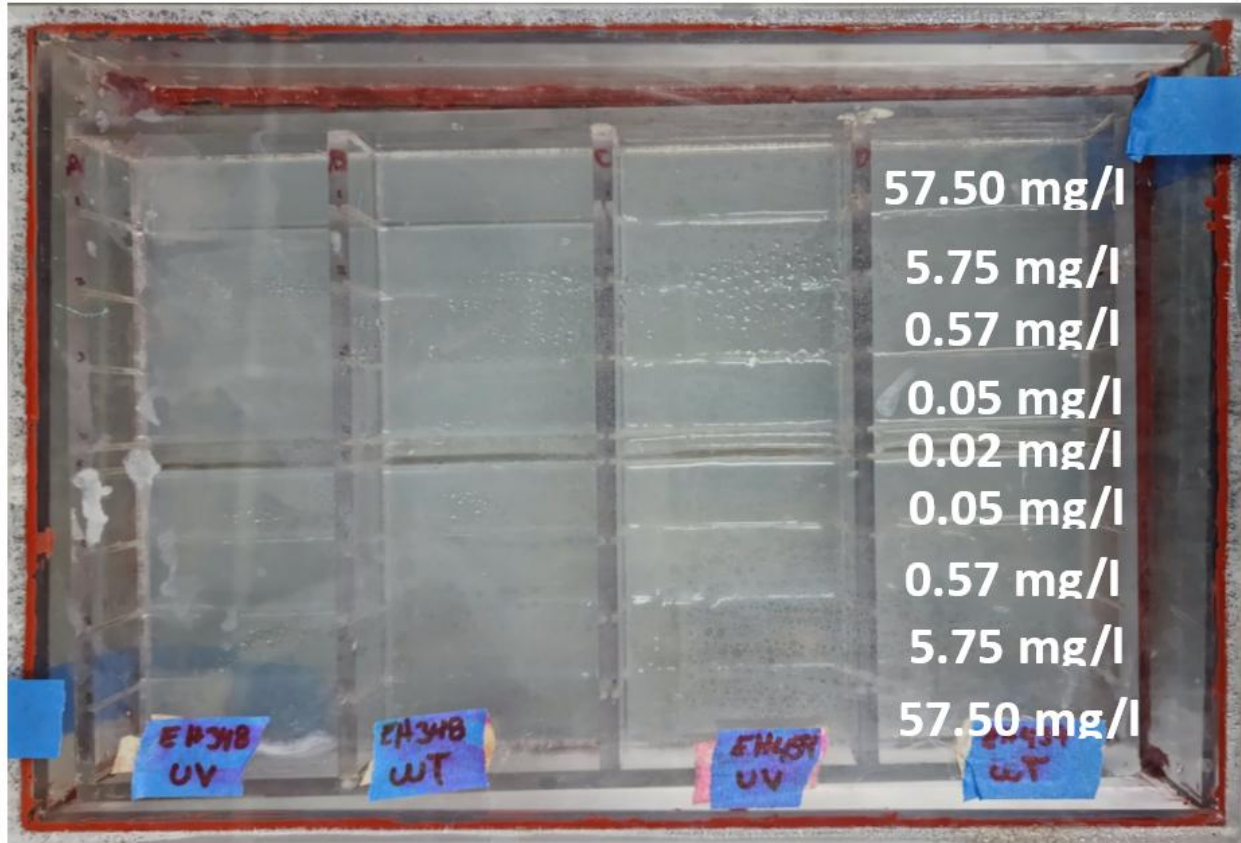


Fig. 7. Vista superior de la placa MEGA. Se señala el pozo central donde se realiza la siembra de conidios en MM con 0.02 mg/l de TEB y el incremento gradual de la concentración en las etapas consecutivas.

Los cultivos testigo se sembraron con suspensiones ( $1 \times 10^6$  con/ml) de las cepas EH-348/2WT y EH-459WT. Por otra parte, se realizó la mezcla de suspensiones de conidios a partir de los conidios cosechados de las colonias aisladas después del proceso de radiación UV-C. Estas fueron nombradas EH-348/2UV y EH-459UV. La importancia de este paso reside en incrementar la variabilidad de los conidios provenientes de diferentes colonias capaces de crecer en presencia de TEB, para incrementar la probabilidad de que emerja una nueva cepa mejor adaptada (Jiang *et al.*, 2010). Finalmente, se agregaron 700  $\mu$ l de suspensión de conidios ( $1 \times 10^6$  con/ml) de cada inoculo en la línea central de la placa. La caja MEGA inoculada se incubó a  $26 \pm 1$  °C, con un fotoperiodo 12:12 por 30 días.

Una vez terminado el proceso de presión selectiva en las placas MEGA, se tomó una muestra de cada UFC que creció en presencia de 5.75 mg/l y 57.50 mg/l de TEB ( $1 \times$  y  $10 \times$  de acuerdo con la dosis recomendada

por el proveedor para la aplicación en campo, respectivamente), se sembraron en PDAY-TEB y MM-TEB para confirmar la capacidad de mantener la resistencia al fungicida. La nomenclatura utilizada para cada cepa resistente fue la siguiente: el nombre original del aislado (EH-348/2 o EH-459), un número consecutivo del aislado, las siglas si proviene de las cepas silvestres o irradiadas (WT o UV), y la concentración de TEB en la que fueron aisladas (H para las que crecieron en 5.75 mg/l y K para 57.50 mg/l de TEB).

#### **7.6. Comparación del crecimiento y conidiación de los aislados WT y UV**

Para determinar si se presentaron alteraciones en el desarrollo vegetativo y producción de conidios, se comparó ambos factores en cajas de Petri con las cepas WT y UV en medio PDAY y MM, con las variantes adicionadas con TEB. Se utilizó la dosis CMI inicial del fungicida (0.01 mg/l) ya que permite el crecimiento de los aislados silvestres. Cada caja de Petri se inoculó al colocar 10 µl de suspensión ajustada ( $1 \times 10^6$  con/ml) dentro de un pozo en el centro de las placas. El crecimiento radial se midió por 7 días y al paso de este tiempo, se tomó 1 cm<sup>2</sup> de cultivos en césped para extraer los conidios y cuantificarlos en cámara Neubauer.

#### **7.7. Estimación semicuantitativa de la producción de proteasas, lipasas y quitinasas**

La estimación de la producción de proteasas, lipasas y quitinasas en las cepas UV se llevó a cabo mediante la observación de formación de un halo en el medio de cultivo al que se agregó leche descremada, Tween 20 y quitina, respectivamente; se comparó con la actividad enzimática presente en las cajas con los aislados WT que fueron tomados como testigo. El medio agar leche descremada (ALD) se preparó de acuerdo a Shivani y Kumar (2015) con NaCl 0.03 g, MgSO<sub>4</sub> 0.3 g, 0.15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g de leche descremada deshidratada y 20 g de agar en 1000 ml; para el Agar Tween (AT) se realizó con 10 g de peptona, NaCl 5 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g, 20 g de agar, pH 6 por cada 1000 ml, y 10 ml/l de Tween 20 (Hankin y Agnostakis, 1975); y para el agar quitina (AQ) se utilizó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7 g, KHPO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g, ZnSO<sub>4</sub> 0.001 g, MnCl<sub>2</sub> 0.001 g, 4 g de quitina coloidal, y 20 g de agar en 1000 ml (Hsu y Lockwood, 1975). Las cajas de Petri se inocularon con 10 µl ajustada a  $1 \times 10^6$  con/ml de cada cepa en el centro, se incubaron a 27 °C por 7 días para observar las zonas claras en el medio y el precipitado en el caso de AT. La medición semicuantitativa se realizó con el índice de potencia (IP), que se calculó en cada sustrato al dividir el radio de la colonia entre el radio de cada zona clara (halo) o precipitado (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

#### **7.8. Bioensayo de *A. lecanii* contra *Coccus viridis***

El bioensayo para comparar la virulencia de los aislados WT y resistentes a TEB en ninfas de *C. viridis* se llevó a cabo de acuerdo con Vidal *et al.* (1998), y Castellanos-Moguel *et al.* (2007), con modificaciones

menores. Se colectaron hojas de guayaba (*Psidium guajava*) infectadas con *C. viridis*. Subsecuentemente, se cortaron discos de 40 mm de diámetro usando un bisturí estéril y se colocaron en cajas de Petri de 50 mm de diámetro. Cada unidad experimental constó de 30 ninfas seleccionadas de manera aleatoria, e identificadas con un punto colocado en las hojas con un marcador permanente cerca de los insectos. Los discos de tejido vegetal se desinfectaron por inmersiones secuenciales en 70 % alcohol (5 s), agua destilada esterilizada (40 s), hipoclorito de sodio al 5 % (20 s) y, seguida de tres enjuagues con agua destilada estéril (40 s). Las hojas se secaron a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar previo a ser expuestas a los conidios de cada cepa.

Para el bioensayo, cada unidad experimental se sumergió por 10 s en una suspensión de conidios ajustada a  $1 \times 10^6$  con/ml, se colocaron en las cajas de Petri con medio de cultivo KNOP para tejido vegetal y se incubaron por 10 días a 26 °C, con fotoperiodo 12:12. Se utilizó como testigo hojas infectadas con *C. viridis* sumergidas en Tween 80 al 0.01 %. La mortalidad de las ninfas se registró cada 24 h.

#### **7.9. Bioensayo de *A. lecanii* contra *Cladosporium* sp.**

Para llevar a cabo el bioensayo de micoparasitismo, se utilizó un hongo del género *Cladosporium* aislado a partir de muestras ambientales; algunas especies de este género son fitopatógenas (Zheng *et al.*, 2025). Se evaluó el crecimiento micelial de las cepas WT y UV de *A. lecanii* sobre colonias de *Cladosporium* sp., para ello, se utilizaron cajas de Petri con medio de cultivo PDAY, se realizaron pozos en el centro de cada caja para trasplantar un fragmento de colonia de *Cladosporium* con crecimiento de 5 días. Las cajas se dejaron incubar por dos días para que el cultivo se estableciera y mostrara crecimiento. Por otra parte, se realizaron suspensiones de conidios de conidios de cada cepa y se ajustaron a  $1 \times 10^6$  con/ml, en ausencia y en presencia de varias concentraciones de TEB (1.43 mg/l, 2.87 mg/l, y 4.31 mg/l), para observar si se presentaba un efecto inhibitorio en el desarrollo de los conidios de *A. lecanii*.

Una vez listas las suspensiones, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se colocó en el centro de las colonias de *Cladosporium*, se incubaron durante 3 días a 26 °C con fotoperiodo 12:12 y se registró el progreso mediante fotografías cada 24 h. Una vez terminada la etapa experimental, se analizaron las imágenes con el programa ImageJ y se determinó el porcentaje de colonización mediante la división del área cubierta por las cepas WT y UV de *A. lecanii* entre el área total del hongo hospedero, el resultado se multiplicó por 100 (García-Nevárez e Hidalgo-Jaminson, 2019). Como testigo se utilizó colonias de *Cladosporium* a las que se les agregó únicamente agua destilada estéril con Tween al 0.05 % y en las demás variantes, agua estéril con Tween y las concentraciones de TEB antes mencionadas.

### **7.10. Análisis estadístico**

Todos los ensayos llevados a cabo se realizaron por triplicado, los datos obtenidos se analizaron utilizando ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) y comparación de medias de Tukey, regresión lineal y regresión curvilínea de acuerdo con lo requerido en cada experimento. El análisis se realizó con el programa estadístico IBM-SPSS 18v.

## 8. Resultados

### 8.1. Concentración mínima inhibitoria de TEB en *A. lecanii*

El efecto del TEB en el crecimiento y producción de conidios se determinó para ambas cepas WT de *A. lecanii* en PDAY y MM. Ninguno de los aislados fue capaz de crecer en dosis del fungicida entre 0.02 mg/l y 5.75 mg/l (dosis recomendada por el proveedor). Sin embargo, se observó crecimiento en la dosis más baja de TEB (0.01 mg/l) en las cepas EH-348/2WT y EH-459WT, en ambos medios. El crecimiento radial se afectó significativamente para los dos aislados por la presencia del TEB, particularmente en el MM. Además, *A. lecanii* EH-459WT fue más sensible al fungicida ya que su crecimiento se redujo severamente en los dos medios de cultivo. Por otra parte, la producción de conidios disminuyó drásticamente en PDA-TEB y se inhibió completamente en el MM-TEB (Tabla 1).

Tabla. 1. Crecimiento radial y producción de conidios de *Akanthomyces lecanii* en medios de cultivo con y sin TEB.

<i>A. lecanii</i>	Medio de cultivo	Crecimiento radial (mm/d)	Producción de conidios ( $\times 10^6$ con/cm <sup>2</sup> )
EH-348/2WT	PDAY	0.64 $\pm$ 2.51E-05 <sup>a</sup>	1.200 $\pm$ 0.050 <sup>a</sup>
	MM	0.50 $\pm$ 0.00E+00 <sup>b</sup>	0.337 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
	PDAY-TEB 0.01 mg/l	0.42 $\pm$ 0.105E-05 <sup>b</sup>	0.005 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>
	MM-TEB 0.01 mg/l	0.28 $\pm$ 0.525E-05 <sup>c</sup>	- $\pm$ -
EH-459WT	PDAY	0.64 $\pm$ 2.51E-05 <sup>a</sup>	0.770 $\pm$ 0.057 <sup>a</sup>
	MM	0.50 $\pm$ 0.00E+00 <sup>a</sup>	0.350 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
	PDAY-TEB 0.01 mg/l	0.57 $\pm$ 7.53E-05 <sup>a</sup>	0.002 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>
	MM-TEB 0.01 mg/l	0.13 $\pm$ 0.004E-05 <sup>b</sup>	- $\pm$ -

Las medias etiquetadas con la misma letra no mostraron diferencia estadística significativa.

### 8.2. Mutagénesis por radiación UV

La susceptibilidad de las cepas de *A. lecanii* a la radiación UV se analizó para determinar el tiempo de irradiación óptimo para inducir mutagénesis por radiación ultravioleta. La figura 8 muestra la supervivencia (%) de *A. lecanii* en función del tiempo de exposición de acuerdo con el ajuste a la curva de decrecimiento exponencial. La intersección con el eje X marcada con la línea punteada indica el tiempo de exposición de cada cepa para obtener la supervivencia del 35 % de UFC; esto ocurrió a los 88.8 s y 39.4 s para EH-348/2WT y EH-459WT, respectivamente. Adicionalmente, un ligero incremento en el conteo de colonias

se observó después de 30 s de exposición en ambas cepas, y una mayor sensibilidad a la radiación UV-C en EH-459WT.

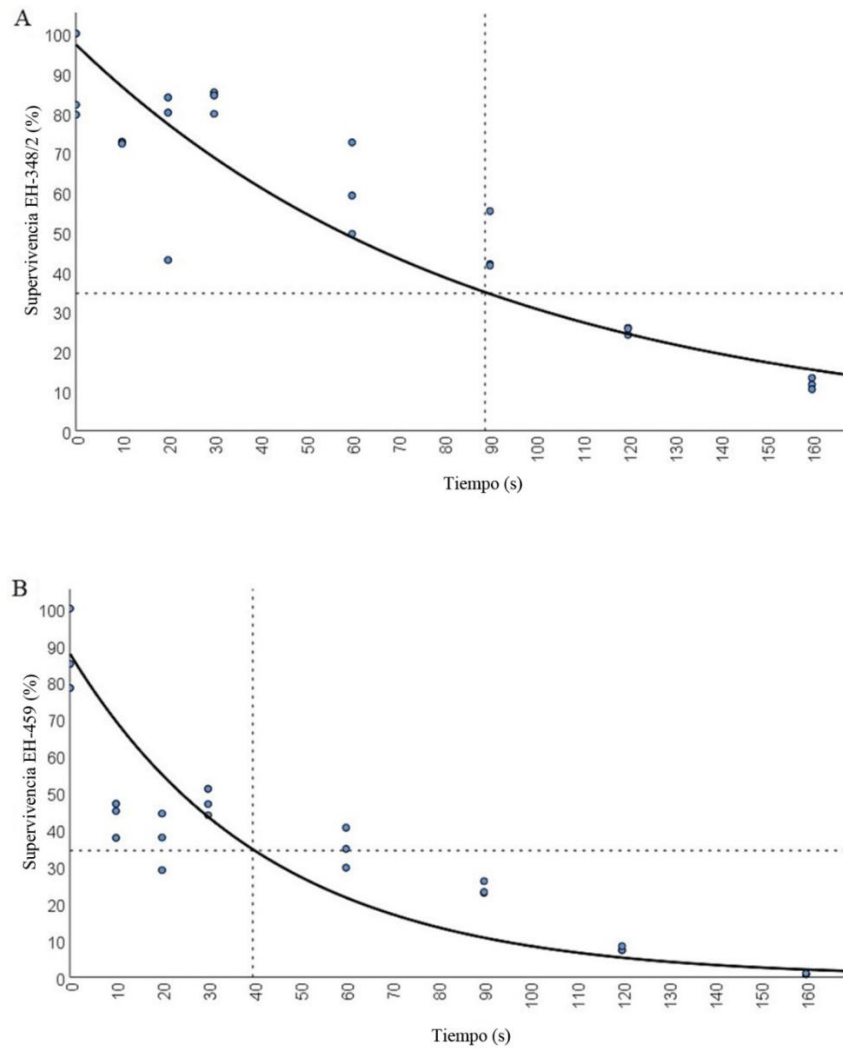


Fig. 8. Estimación de la supervivencia (%) en las cepas EH-348/2WT y EH-459WT en función del tiempo de exposición (s) a radiación UV. La línea punteada indica el tiempo de exposición en el que se provoca una mortalidad del 65 % en cada aislado; A) 88.8 s para EH-348/2WT y B) 39.4 s para EH-459WT.

### **8.3. Cultivo en la Arena de Crecimiento y Evolución Microbiano (MEGA)**

Los conidios provenientes de colonias que sobrevivieron a la radiación UV se usaron para inocular la placa MEGA como se describió en la metodología; al paso de 30 días de incubación, se observaron distintas colonias. Tres UFC se obtuvieron de EH-348/2 irradiada, capaces de crecer a 57.5 mg/l de TEB (EH-348/2.1UVK – EH-348/2.3UVK), y ocho a 5.75 mg/l de TEB (EH-348/2.1UVH – EH-348/2.8UVH). Mientras que, para la cepa EH-459UV, se obtuvo una UFC a 5.75 mg/l (EH-459.1UVH).

Además, se aislaron tres UFC de las cepas WT adaptadas a 5.75 mg/l de TEB (EH-348/2.1WTH, EH-348/2.2WTH y EH-348/2.3WTH) y 5 UFC provenientes de EH-459WT (EH-459.1WTH – EH-459.5WTH) (Fig. 9). Posterior a recuperar todas las UFC resistentes e inocularlas en MM con TEB, las cepas EH-348/2.4UVH, EH-348/2.5UVH, y las cinco obtenidas de EH-459WT no fueron capaces de crecer.

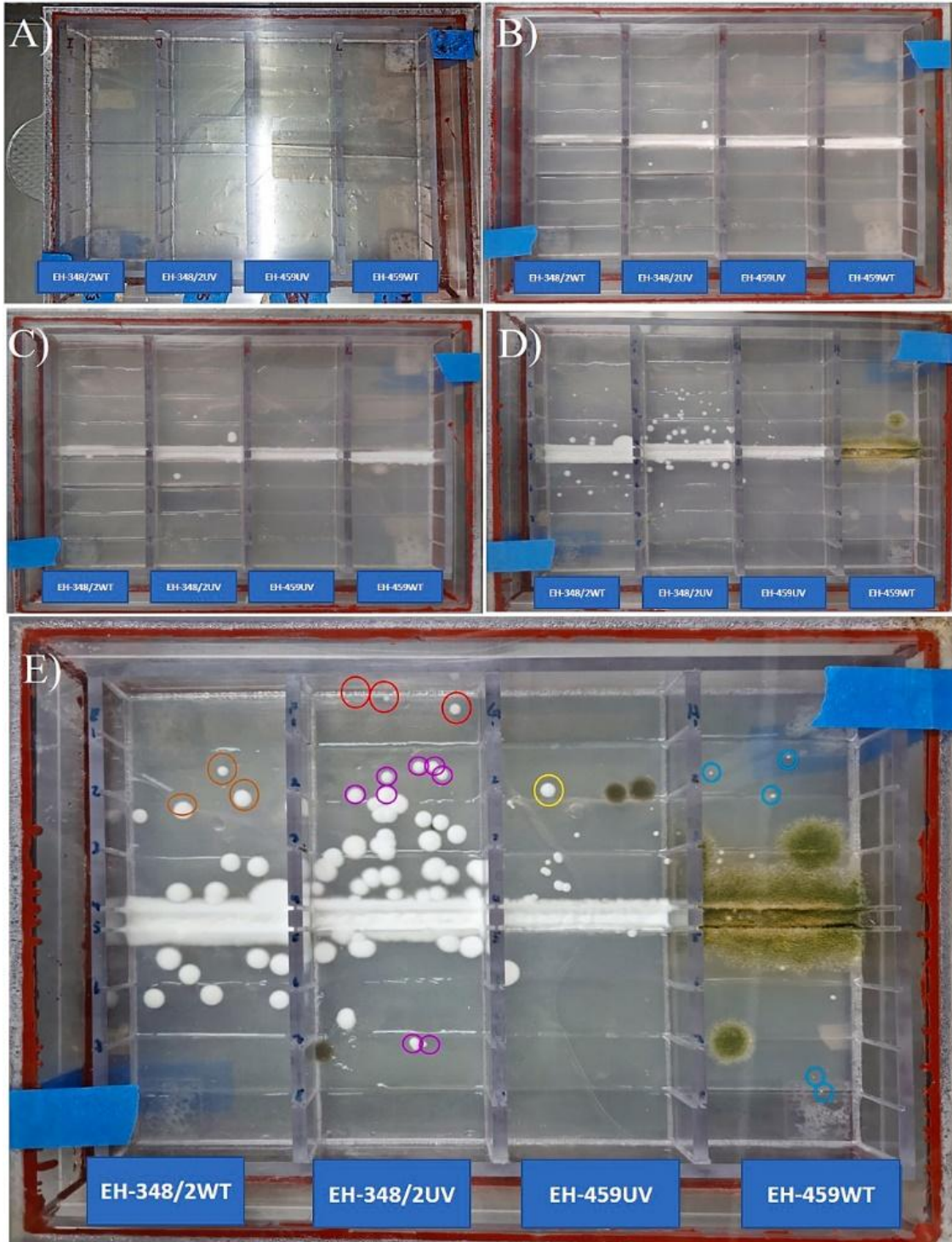


Fig. 9. Crecimiento de *A. lecanii* en la placa MEGA a través del tiempo. A) Caja MEGA inoculada y preparada para incubación, y a los B) 7 días, C) 10 días, D) 20 días, y E) 30 días de incubación; las colonias marcadas dentro de círculos fueron recuperadas y propagadas en cajas Petri con MM adicionado con TEB.

#### **8.4. Comparación del crecimiento y conidiación de los aislados WT y UV**

Posterior a ser aislados los nuevos linajes, se procedió a evaluar el crecimiento y producción de conidios de las cepas resistentes al TEB y comprobar si se presenta alguna alteración respecto a las cepas WT. La tabla 3 muestra la comparación de estas características para las cepas EH-348/2WT, las adaptadas EH-348/2.1WTH – EH-348/2.3WTH, y las colonias generadas a partir de conidios irradiados que crecieron en la placa MEGA a 5.75 mg/l y 57.5 mg/l de TEB (EH-348/2.1UVH - EH-348/2.3UVH, EH-348/2.6UVH - EH-348/ 2.8UVH y EH-348/2.1UVK – EH-348/2.3UVK). En donde el cultivo en PDAY solo mostró para EH-348/2.2UVK un ligero decrecimiento en el desarrollo micelial comparado con las otras cepas; en PDAY-TEB, la cepa EH-348/2.2UVH mostró un mayor crecimiento de micelio; mientras que en MM y MM-TEB, no se observó una diferencia significativa entre los aislados.

En el caso de las cepas EH-459WT y EH-459.1UVH, la cepa WT mostró menor crecimiento radial, aún en comparación con EH-348/2WT y los aislados UV. La mayor producción de conidios se cuantificó en PDAY para la cepa EH-348/2.2WTH, seguida de EH-459UVH, y la menor producción se registró para EH-348/2.2UVK, seguida de EH-348/2.1UVH, EH-348/2.3WTH, y EH-459WT. En PDAY-TEB, la mayor producción de conidios se cuantificó para EH-348/2.1WTH, seguida de EH-348/2.3UVH, la menor producción fue mostrada por EH-348/2.2UVK. En medio MM, la cepa con mayor conidiación fue EH-348/2.2WTH, seguida de EH-348/2.2UVH y las menos productivas fueron EH-348/2.2UVK, EH-348/2.1UVK y EH-348/2.3WTH. Mientras que la mayor producción de conidios en MM-TEB se cuantificó para EH-459.1UVH y EH-348/2.1WTH, y EH-348/2.3WTH, la menor producción se registró en EH-348/2.2WTH.

Tabla. 2. Crecimiento radial y producción de conidios en *A. lecanii* EH-348/2WT, EH-459WT y las cepas aisladas de la placa MEGA usando medio de cultivo con y sin TEB.

<i>A. lecanii</i>		Crecimiento radial (mm/d)				Producción de conidios ( $\times 10^6$ ) con/cm <sup>2</sup>			
Cepa	PDAY	PDAY-TEB	MM	MM-TEB	PDAY	PDAY-TEB	MM	MM-TEB	
EH-348/2WT	0.55 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.10 <sup>b,c</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.07 <sup>e,f,g,h</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>f,g,h</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>e,f</sup>	0.92 ± 0.27 <sup>c,d</sup>	
EH-348/2.1WTH	0.56 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.70 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.51 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.77 ± 0.27 <sup>a</sup>	
EH-348/2.2WTH	0.58 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.64 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>d</sup>	1.63 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>f</sup>	
EH-348/2.3WTH	0.61 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.71 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.16 <sup>g,h</sup>	0.69 ± 0.13 <sup>d</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>f</sup>	1.29 ± 0.06 <sup>b</sup>	
EH-348/2.1UVH	0.53 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.10 <sup>a,b</sup>	0.61 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>g,h</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>f,g</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>e,f</sup>	0.52 ± 0.06 <sup>e</sup>	
EH-348/2.2UVH	0.63 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.16 <sup>c,d,e,f</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.39 ± 0.19 <sup>a,b</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>b,c</sup>	
EH-348/2.3UVH	0.59 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.69 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.13 <sup>d,e,f,g</sup>	1.15 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>c,d</sup>	0.39 ± 0.04 <sup>e,f</sup>	
EH-348/2.6UVH	0.56 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.68 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>c,d,e</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.55 ± 0.12 <sup>d,e</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>e,f</sup>	
EH-348/2.7UVH	0.57 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.67 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>e,f,g,h</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>h,i</sup>	0.95 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>e</sup>	
EH-348/2.8UVH	0.63 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	0.65 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>d,e,f,g</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>g,h</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>e,f</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>e,f</sup>	
EH-348/2.1UVK	0.57 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.12 <sup>a,b</sup>	0.63 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>e,f,g,h</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>d,e</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.63 ± 0.02 <sup>d,e</sup>	
EH-348/2.2UVK	0.50 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>a,b</sup>	0.56 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>g,h</sup>	0.11 ± 0.00 <sup>i</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>f</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>f</sup>	
EH-348/2.3UVK	0.58 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>e,f</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>e,f</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>e,f</sup>	
EH-459WT	0.38 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.00 <sup>f,g,h</sup>	0.24 ± 0.07 <sup>f,g,h</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>e,f</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>e,f</sup>	
EH-459.1UVH	0.56 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.14 <sup>a,b</sup>	0.61 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>d,e</sup>	1.92 ± 0.06 <sup>a</sup>	

Las medias etiquetadas con la misma letra no mostraron diferencia estadística significativa.

### 8.5. Estimación semicuantitativa de la producción de proteasas, lipasas y quitinasas

La estimación semicuantitativa de actividad enzimática mostró actividad similar en la producción de proteasas entre las cepas, a excepción de EH-459WT que mostró una mayor actividad significativa. Los resultados indican que la mayor producción de lipasas y quitinasas entre los aislados se presentaron en EH-348/2.2UVK y la menor actividad en EH-348/2WT. Mientras que EH-459WT mostró la mayor actividad quitinolítica, EH-348/2.1UVH y EH-348/2WT la menor (Tabla 4).

Tabla. 3. Determinación semicuantitativa (índice de potencia, IP) de la actividad de proteasas, lipasas y quitinasas en *A. lecanii* EH-348/2WT, EH-459WT y las cepas resistentes a TEB obtenidas de la placa MEGA. Menor IP indica una mayor actividad enzimática.

<i>A. lecanii</i>	IP Proteasa	IP Lipasa	IP Quitinasa
EH-348/2WT	0.83 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.92 ± 0.00 <sup>e</sup>
EH-348/2.1WTH	0.86 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.04 <sup>b,c,d</sup>	0.85 ± 0.04 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-348/2.2WTH	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.04 <sup>a,b,c,d</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>c,d,e</sup>
EH-348/2.3WTH	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.04 <sup>a,b,c</sup>	0.83 ± 0.05 <sup>b,c,d</sup>
EH-348/2.1UVH	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.00 <sup>a,b</sup>	0.90 ± 0.03 <sup>d,e</sup>
EH-348/2.2UVH	0.84 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.10 <sup>b,c,d</sup>	0.81 ± 0.02 <sup>a,b,c,d</sup>
EH-348/2.3UVH	0.84 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>a,b,c,d</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-348/2.6UVH	0.84 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>	0.86 ± 0.02 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-348/2.7UVH	0.88 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	0.88 ± 0.01 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-348/2.8UVH	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.06 <sup>a,b,c</sup>	0.88 ± 0.00 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-348/2.1UVK	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>c,d</sup>	0.80 ± 0.06 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.2UVK	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>a,b</sup>
EH-348/2.3UVK	0.85 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.00 <sup>c,d</sup>	0.86 ± 0.02 <sup>b,c,d,e</sup>
EH-459WT	0.63 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.08 <sup>b,c,d</sup>	0.73 ± 0.00 <sup>a</sup>
EH-459.1UVH	0.86 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>b,c,d</sup>

Las medias etiquetadas con la misma letra no mostraron diferencia estadística significativa.

### **8.6. Bioensayo de *A. lecanii* contra *Coccus viridis***

Posterior a los 10 días del bioensayo con *C. viridis*, se observó que la mayoría de los aislados de *A. lecanii* produjeron una mortalidad mayor al 80 %. La prueba de HSD de Tukey mostró una diferencia significativa únicamente para EH-348/2.2WTH, ya que provocó la menor mortalidad en los insectos entre todas las cepas probadas. La cinética de mortalidad (Fig. 10) mostró en A) que EH-348/2WT alcanzó el 100 % de mortalidad de *C. viridis* en 8 días, dos días antes que las cepas derivadas EH-348/2.1WTH, EH-348/2.2WTH y EH-348/2.3WTH. Por otro lado, la cepa EH-348/2.2WTH mostró menor virulencia, eliminando menos de la mitad de la población al final del experimento; B) y C) denotaron un comportamiento similar para las cepas resistentes a TEB derivadas de EH-348/2 expuesta a radiación UV-C, EH-348/2.1UVH mostró un mayor efecto inicial que el resto de las cepas, con el 100 % de mortalidad en 7 días (Fig. B), y EH-348/2.3UVK mató más del 90 % de los insectos en 6 días (Fig. C); D) muestra que EH-459.1UVH provocó una mayor mortalidad en *C. viridis* que la cepa WT, sobrepasando el 90 % de mortalidad en 7 días.

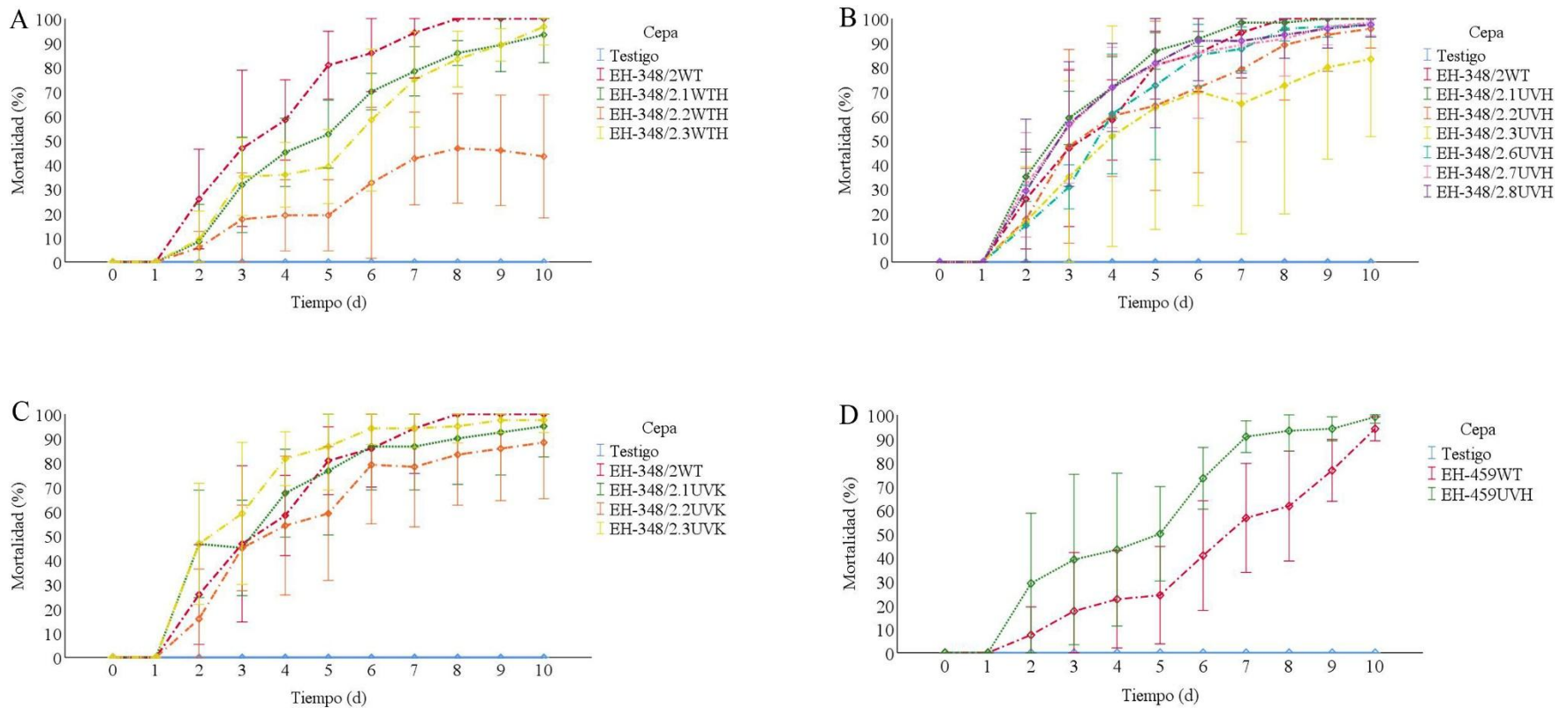


Fig. 10. Cinética de mortalidad de *C. viridis* expuestos a conidios de diferentes cepas de *A. lecanii*. A) cepas resistentes a TEB derivadas de EH-348/2 sin ser expuestas a radiación UV-C; B) y C) cepas resistentes a TEB obtenidas a partir de EH-348/2WT expuestas a radiación UV-C y aisladas de la placa MEGA en presencia de 5.75 mg/l y 57.5mg/l de TEB, respectivamente; y D) cepas resistentes a TEB derivadas de EH-459WT sometidas a radiación UV.C y aisladas de la placa MEGA en presencia de 5.75 mg/l de TEB.

### **8.7. Bioensayo de *A. lecanii* contra *Cladosporium* sp.**

Durante los 3 días de bioensayo se evaluó el crecimiento micelial de *Cladosporium* y el efecto micoparasitario de las cepas WT y UV de *A. lecanii* en ausencia de TEB, y en concentraciones de 1.43, 2.87 y 4.31 mg/l (Tabla 5). Todos los tratamientos mostraron algún grado de inhibición del desarrollo del hospedero, independientemente de la concentración del fungicida. En el tratamiento sin TEB (0 mg/l), la prueba HSD de Tukey permitió identificar diferencias significativas entre las cepas evaluadas, la mutante EH-348/2.3UVK presentó el mayor crecimiento sobre *Cladosporium*, lo que indicó un mayor efecto parasitario, mientras que EH-348/2.3WTH y EH-348/2.2UVH tuvieron los valores más bajos; al incorporar TEB en la concentración 1.43 mg/l, se mantuvo la variabilidad entre los aislados, la cepa EH-348/2.1UVK presentó el mayor desarrollo micelial sobre el hospedero, mientras que en los aislados UVH se registró un menor efecto antagonista; en las suspensiones con 2.87 mg/l de TEB, la mutante EH-348/2.2UVK tuvo el mayor crecimiento sobre *Cladosporium*. Por otra parte, un amplio grupo de aislados (EH-348/2WT, EH-348/2.3WTH, EH-348/2.1UVH, EH-348/2.3UVH, EH-348/2.6UVH, EH-348/2.7UVH, EH-348/2.8UVH y EH-459.1UVH) mostraron menor capacidad parasitaria; finalmente, en el tratamiento con la concentración 4.31 mg/l de TEB, la mutante EH-348/2.2WTH registró el valor más alto crecimiento, con una elevada capacidad de colonización del hospedero en condiciones de mayor estrés químico, mientras que las cepas EH-348/2.3WTH y EH-348/2.1UVH presentaron los valores más bajos. Estos resultados evidencian que, aunque las concentraciones de TEB pueden modular el desarrollo de *A. lecanii*, la actividad micoparasitaria se mantiene.

Tabla. 4. Crecimiento de las cepas WT y UV de *A. lecanii* sin TEB y con concentraciones (mg/l) de 1.43, 2.87, y 4.31 de TEB.

Crecimiento de las cepas WT y UV de <i>A. lecanii</i> (mm <sup>2</sup> )				
Cepa	0 mg/l	1.43 mg/l	2.87 mg/l	4.31 mg/l
Testigo	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>
Testigo + TEB	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>c</sup>
EH-348/2WT	85.78 <sup>a,b,c</sup>	48.98 <sup>b,c</sup>	43.29 <sup>c,d</sup>	137.78 <sup>a,b</sup>
EH-348/2.1WTH	48.95 <sup>a,b,c</sup>	40.86 <sup>a,b,c</sup>	54.99 <sup>b,c,d</sup>	84.88 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.2WTH	54.38 <sup>a,b,c</sup>	45.30 <sup>b,c</sup>	51.40 <sup>b,c,d</sup>	153.37 <sup>a</sup>
EH-348/2.3WTH	18.74 <sup>c</sup>	30.07 <sup>b,c</sup>	19.59 <sup>c,d</sup>	33.19 <sup>b,c</sup>
EH-348/2.1UVH	28.42 <sup>b,c</sup>	38.07 <sup>b,c</sup>	37.91 <sup>c,d</sup>	40.74 <sup>b,c</sup>
EH-348/2.2UVH	18.79 <sup>c</sup>	42.75 <sup>b,c</sup>	49.97 <sup>b,c,d</sup>	49.31 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.3UVH	30.29 <sup>b,c</sup>	25.32 <sup>b,c</sup>	19.59 <sup>c,d</sup>	47.54 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.6UVH	51.58 <sup>a,b,c</sup>	37.75 <sup>b,c</sup>	45.48 <sup>c,d</sup>	55.94 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.7UVH	21.51 <sup>c</sup>	42.02 <sup>b,c</sup>	42.21 <sup>c,d</sup>	46.01 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.8UVH	38.28 <sup>b,c</sup>	34.13 <sup>b,c</sup>	36.12 <sup>c,d</sup>	59.12 <sup>a,b,c</sup>
EH-348/2.1UVK	141.34 <sup>a,b</sup>	125.03 <sup>a</sup>	71.46 <sup>a,b,c,d</sup>	127.74 <sup>a,b</sup>
EH-348/2.2UVK	106.75 <sup>a,b,c</sup>	101.82 <sup>a,b</sup>	139.65 <sup>a</sup>	111.80 <sup>a,b</sup>
EH-348/2.3UVK	154.28 <sup>a</sup>	88.63 <sup>a,b</sup>	122.24 <sup>a,b</sup>	102.18 <sup>a,b,c</sup>
EH-459WT	109.34 <sup>a,b,c</sup>	98.70 <sup>a,b</sup>	82.51 <sup>a,b,c</sup>	70.27 <sup>a,b,c</sup>
EH-459.1UVH	37.05 <sup>b,c</sup>	41.84 <sup>b,c</sup>	48.09 <sup>c,d</sup>	98.06 <sup>a,b,c</sup>

Las medias etiquetadas con la misma letra no mostraron diferencia estadística significativa.

La actividad micoparasitaria de las cepas WT y UV de *A. lecanii* contra *Cladosporium* se puede observar en la reducción del crecimiento micelial del hospedero (mm<sup>2</sup>) como en el porcentaje de micoparasitismo registrado en los distintos tratamientos (Fig. 11). En ausencia de TEB (figura A), el crecimiento de *Cladosporium* fue notablemente reducido en presencia de todas las cepas evaluadas, en comparación con el testigo. Aun así, se observó variabilidad intraespecífica. En este tratamiento, los aislados UVK presentaron los menores valores de crecimiento del hospedero, y los mayores porcentajes de micoparasitismo, en comparación a los registrados en las cepas WT y en la mayoría de aislados UVH; en los tratamientos 1.43 y 2.87 mg/l (figuras B y C), se observó una reducción general del desarrollo micelial del hospedero, tanto en el testigo adicionado con TEB, como en los tratamientos con *A. lecanii*. La presencia del fungicida no afectó la capacidad antagonista de los aislados. En estos tratamientos, los aislados UVK mostraron la mayor actividad micoparasitaria; al evaluar la mayor concentración de TEB (figura D), el crecimiento de *Cladosporium* fue bajo en todos los tratamientos, lo que puede indicar un efecto combinado del fungicida y la acción hiperparasitaria de *A. lecanii*. Las cepas UVK presentaron los porcentajes micoparasitismo más elevados, lo que sugiere que su interacción antagonista se mantiene e incluso se ve favorecida bajo condiciones de mayor estrés químico. Adicionalmente, aunque las concentraciones de TEB fueron relativamente bajas al ser ajustadas a las suspensiones de conidios, se registró una disminución en el crecimiento del testigo tratado únicamente con fungicida.

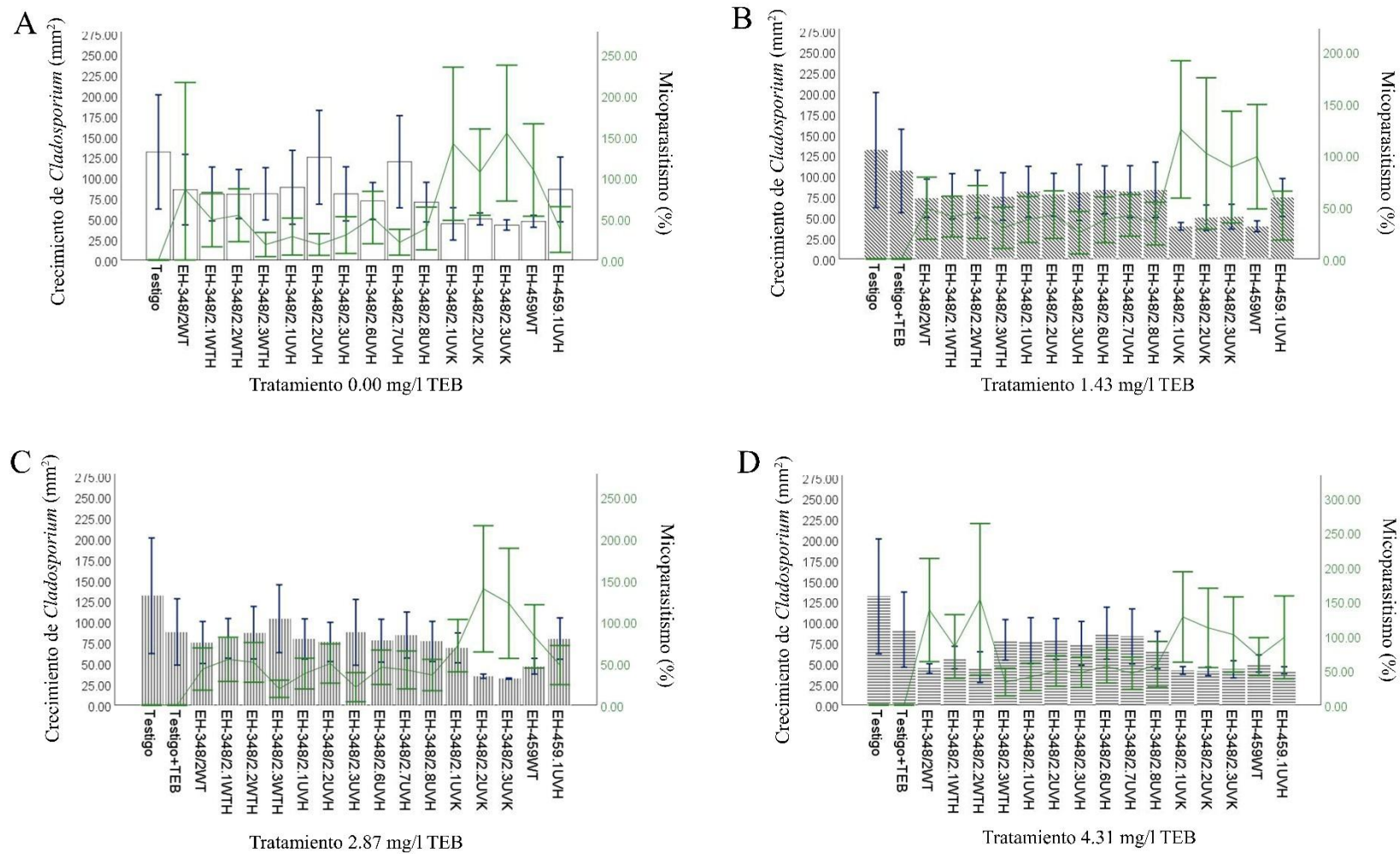


Fig. 11. Comparación del desarrollo micelial de *Cladosporium* (mm<sup>2</sup>) y efecto micoparasítico de las cepas WT y UV de *A. lecanii* (%). A) Tratamiento sin TEB; B) Tratamiento con 1.43 mg/l de TEB; C) Tratamiento con 2.87 mg/l de TEB; y D) Tratamiento con 4.31 mg/l de TEB.

## 9. Discusión

El efecto que tienen los fungicidas como el TEB sobre los hongos que son usados para el control biológico de plagas es desconocido en condiciones naturales. Aunque, la presencia del agroquímico en campo puede afectar la dinámica de las comunidades fúngicas asociadas a los cultivos al alterar su estructura, al reducir la diversidad, sus biomásas, desarrollo y las interacciones microbianas en el suelo (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2017), así como el establecimiento de los ACB fúngicos. En contraparte, el efecto de este fungicida ha sido ampliamente documentado en distintos cultivos, donde se han aislado hongos fitopatógenos como *Pyricularia* spp. (Dorigan *et al.*, 2017), *Monilinia frutícola* (Lichtemberg *et al.*, 2017) y *Alternaria alternata* (Ren *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2022), adaptados a la presencia de este plaguicida. Además, este efecto ha sido documentado en el hongo patógeno para humanos *Aspergillus fumigatus* (Faria-Ramos *et al.*, 2014; García-Rubio *et al.*, 2017; Sharpe *et al.*, 2018; Lestrade *et al.*, 2019; García-Rubio *et al.*, 2019). En ambos casos, la exposición continua a este compuesto ha favorecido una presión selectiva en la que se generan nuevos linajes resistentes (Zhang *et al.*, 2017).

Por otra parte, existen estudios *in vitro* sobre la influencia de los fungicidas en la germinación de conidios y crecimiento de distintos hongos entomopatógenos; en este sentido se ha reportado en cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que el TEB inhibe por completo la germinación de los conidios y suprime el crecimiento, efecto que dificulta el manejo de plagas con HE (Khan *et al.*, 2012); en las cepas de *B. bassiana* Bb-18 y *M. anisopliae* Ma-30, se observó una inhibición de la germinación de conidios, así como un efecto negativo en ambas cepas al ser usadas como endófito de *Phaseolus vulgaris* (Ramos *et al.*, 2022). Sin embargo, la compatibilidad entre fungicidas y HE es altamente dependiente de los hongos evaluados (Shah *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 2020), en *M. rileyi* se evaluó el efecto del TEB en el desarrollo micelial, donde se registró una inhibición del 12.36 % y una mayor producción de conidios, por lo que se catalogó como “seguro” el uso del fungicida en combinación con el entomopatógeno. Considerar a una cepa tolerante o resistente a un fungicida, es parte del proceso de adaptación y evolución, donde al presentarse un estresor como el agroquímico, ejerce una presión selectiva sobre una población. De esta manera, la población silvestre se elimina, mientras que la resistente no se ve alterada (Zapata-Narváez y Botina-Azain, 2023). De esta manera, la resistencia mostrada por *M. rileyi* puede entenderse como un efecto derivado de una previa exposición al fungicida en un ambiente natural, por lo que cuenta con mecanismos de resistencia.

En el caso del efecto del TEB en el hongo *A. lecanii*, se han identificado cepas con distintas susceptibilidades. Castellanos-González *et al.* (2012), reportó después de evaluar en concentraciones de 10 a 2000 mg/kg (ppm) de TEB que el fungicida es altamente tóxico para la cepa Y-57, ya que inhibió por completo el crecimiento micelial y la producción de conidios en todas las concentraciones. Además, Reddy *et al.* (2018), observaron desarrollo vegetativo muy limitado en las concentraciones de 1 ppm a 10 ppm,

equivalentes a 1 y 10 mg/l del triazol presente en el medio de cultivo. Por lo que se consideró a las cepas incapaces para un uso simultaneo con TEB, así como para ser empleadas en un sitio donde se ha utilizado previamente el fungicida ya que tiene un tiempo de vida medio en suelo entre 49 a 610 días bajo condiciones aeróbicas (Muñoz-Leoz *et al.*, 2011; Strickland *et al.*, 2004).

En el trabajo de esta tesis, posterior a la adición del TEB al medio de cultivo en concentraciones de 5.75 mg/l en los aislados EH-348/2 y EH-459 de *A. lecanii*, se provocó una total inhibición en ambas cepas. Sin embargo, al disminuir la concentración del fungicida a 0.01 mg/l, menor al 1 % de acuerdo con lo recomendado por el proveedor, ambas cepas mostraron crecimiento micelial y producción de conidios. Aunque se ha reportado la aparición de aislados de HE resistentes en bajas concentraciones de fungicidas cuando son cultivados en medios menos nutritivos (Rangel *et al.*, 2010), la presencia del TEB en el medio de cultivo afectó ambos parámetros, particularmente en MM. Por lo que las dos cepas se consideraron altamente susceptibles al TEB.

El alto grado de susceptibilidad al TEB observado en las cepas EH-348/2 y EH-459 de *A. lecanii*, puede limitar su utilización en agroecosistemas, donde las poblaciones fúngicas se ven comprometidas por la aplicación de fungicidas. Bajo estas condiciones, se genera una presión selectiva sobre los genotipos sensibles y favorece la aparición de ecotipos resistentes. Este proceso, considerado evolutivo, se asocia con la emergencia y establecimiento de poblaciones patógenas con sensibilidad reducida, que representan uno de los mayores retos en el control de enfermedades (Massi *et al.*, 2021). Debido a la forma en la que ocurre las adaptaciones que permiten a las poblaciones persistir ante un estresor como los fungicidas, la evolución experimental ha empleado organismos con esperanza de vida corta (Van den Berg *et al.*, 2018). Donde las altas tasas de reproducción, menor tiempo de vida, permite someter a las poblaciones a estresores determinados y dar seguimiento a los cambios genotípicos y/o fenotípicos asociados al proceso adaptativo (Hawkins, 2024).

Adicionalmente a la presión selectiva que genera la presencia de un fungicida, la aparición de nuevos linajes evolutivos puede incrementarse por la mutagénesis con luz UV (Burns *et al.*, 1986; Cano *et al.*, 2023), que permite obtener cepas resistentes mediante la generación de mutaciones aleatorias (Arora *et al.*, 2020). Debido a que *A. lecanii* EH-348/2WT y EH-459WT son hongos hialinos, y los conidios no poseen pigmentos que los protejan de la radiación, se tuvo que ajustar el tiempo de exposición a la radiación UV-C para obtener una mortalidad del 65 %, correspondiente a 88.8 s y 39.4 s para EH-348/2WT y EH-459WT, respectivamente. Esta diferencia en los tiempos de exposición también se ha reportado en otros aislados de *A. Lecanii*, en los que se registraron porcentajes de mortalidad similares en un tiempo de 60 s (Xie *et al.*, 2018), lo que denota la variabilidad intraespecífica en las cepas con diferente origen geográfico, y resalta

la necesidad de evaluar distintas condiciones para determinar los parámetros óptimos para cada aislado fúngico.

Posterior al proceso de mutagénesis por radiación UV-C, se sembraron los conidios en cajas de Petri para favorecer la selección de colonias resistentes en bajas concentraciones de TEB (0.05 mg/l), ya que la utilización de dosis bajas de un fungicida resulta en un proceso de selección de aislados resistentes (Mikaberidze *et al.*, 2017). Esta etapa permitió observar la presencia de UFC capaces de producir conidios.

Al realizar procesos de evolución experimental, se puede iniciar con un aislado parental, en el cual la evolución depende de las mutaciones que surjan durante el experimento, de forma que se debe asegurar que la exposición continua a un factor que ejerza presión selectiva, e incluso incrementar la presión gradualmente (Van den Bergh *et al.*, 2018), este fue el caso los aislados EH-348/2WT y EH-459WT. También se debe considerar que, si el tamaño de la población crece, de igual forma debe incrementar espacio de cultivo y el medio donde se desarrolla, este incremento en la población experimental puede reducir el riesgo de pérdida de mutaciones durante la deriva génica (Van den Bergh *et al.*, 2018). Estas condiciones se lograron con la modificación de la placa MEGA, que favoreció al tener incrementos graduales en espacio y concentraciones de TEB.

Por otra parte, se puede emplear una mezcla del inóculo con un genotipo conocido (Chen *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2015), de esta forma se disminuye la estocasticidad de la limitación de mutaciones al incrementar la variabilidad en la población (Hawkins, 2024). Así, hacer una mezcla de conidios obtenidos a partir de distintas colonias que crecieron a partir de la irradiación UV-C de EH-348/2 y EH-459, y exponerlos gradualmente a concentraciones en incremento de fungicidas en la placa MEGA, favoreció la aparición de mutantes mucho más resistentes al fungicida. Ambos procesos de evolución experimental, con un aislado parental y con una mezcla de inóculo resultó en el desarrollo de nuevas colonias capaces de crecer en concentraciones de TEB hasta 10 veces mayor que la dosis recomendada por el proveedor, con relación a las aplicaciones en campo.

El incremento gradual del TEB como estresor en cada etapa de la placa MEGA, junto con la variación en las poblaciones clonales, permitió la aparición de nuevos linajes. Incluso en el caso de los conidios no irradiados usados para inocular la placa, en la primera etapa con una dosis baja de TEB se observó el desarrollo de colonias, que denotó una respuesta adaptativa llamada cebado fúngico (fungal priming) (Harish y Oshero, 2022). Esto puede ser resultado de una adaptación causada por la exposición al TEB en campo, que puede estar asociada a una mayor degradación enzimática del fungicida, sobreproducción de proteína objetivo, modificación de la proteína objetivo o la expulsión del compuesto a través de bombas de eflujo (Lucas *et al.*, 2015).

En el caso de los conidios irradiados, EH-348/2 y EH-459, fue posible observar en las primeras etapas la tolerancia a concentraciones bajas de TEB. Posteriormente, los nuevos linajes que emergieron fueron capaces de colonizar los siguientes segmentos con incremento en la concentración de fungicida; esta adaptación al gradiente de TEB se puede explicar como resultado de las mutaciones inducidas por la radiación UV que resulta en alteraciones generales en los perfiles de expresión génica (Miranda-Hernandez *et al.*, 2016). La placa MEGA, resulta una herramienta idónea para el estudio de variedades con la capacidad de adaptarse a la incorporación de distintos compuestos químicos en donde se pueden observar cambios graduales en las cepas a lo largo del tiempo y espacio. Adicionalmente, esta estrategia de presión selectiva permite que el mismo hongo pueda avanzar por los segmentos por el crecimiento micelial o por mecanismos de dispersión favorecidos por la gravedad, la desecación por disminución de humedad relativa o tensión superficial en los conidioforos (Margyar *et al.*, 2016; Money, 2016). En contraste, los quimiostatos, también empleados en experimentos de evolución experimental y presión selectiva, presentan dificultades como la adhesión de los hongos en la pared de los contenedores, la formación de agregados, y el constante suministro de medio y estresor (Gresham y Dunham, 2014). Aunque los quimiostatos ofrecen un alto grado de control experimental, la placa MEGA representa una alternativa metodológica más adecuada para evaluar procesos adaptativos graduales en hongos filamentosos, ya que permite integrar un gradiente de un estresor químico que facilita la observación de adaptaciones fisiológicas, como el crecimiento micelial, así como la emergencia de variantes resistentes a distintas concentraciones del agente químico.

Aunque las cepas de *A. lecanii* EH-348/2UV y EH-459UV fueron capaces de crecer desde concentraciones subletales hasta dosis mayores a las empleadas en campo, se ha reportado que la exposición a bajas concentraciones de un estresor puede incrementar la tasa de mutación y generar inestabilidad genómica en poblaciones clonales, lo que favorece la aparición de nuevas variaciones genéticas, entre ellas alteraciones en los mecanismos de infección (Amaradas y Everhart, 2016; Gambhir *et al.*, 2020). Ante la posibilidad de que los nuevos linajes de las cepas WT y UV puedan crecer en ambientes contaminados con TEB, esta resistencia representa un costo de aptitud en el que se ve afectado el ciclo de vida de los organismos en cuanto a la producción y dispersión de conidios, el crecimiento micelial, la eficiencia de infección o la capacidad para competir con los aislados sensibles al fungicida en un ambiente natural (Mikaberidze y McDonald, 2015).

Al evaluar los nuevos linajes de *A. lecanii* aislados de las etapas con concentraciones altas de en la placa MEGA, no se mostraron diferencias estadísticas en el crecimiento radial entre ellas o al compararlas con las cepas WT; algunas de las cepas exhibieron mayor producción de conidios, particularmente en MM-TEB; de hecho, a pesar del medio de cultivo y la exposición a condiciones de estrés subletales, la producción de conidios se mantiene e incluso incrementa (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). Aun así, no se

pueden descartar alteraciones en el control génico en la conidiación (Park y Yu, 2012). De esta forma, bajo las condiciones probadas, la resistencia adquirida en las cepas WT por procesos de adaptación y en las UV por radiación no tuvo un costo en la aptitud en cuanto al crecimiento micelial ni la conidiación.

Por otra parte, el costo de aptitud también puede alterar la virulencia de los HE, que, sumado a la exposición a radiación UV, se pueden presentar mutaciones en los genes relacionados a la patogénesis de los nuevos linajes (Shin *et al.*, 2020). Debido a que la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y quitinasas está relacionada con la virulencia de HE y se consideran factor de virulencia (Dhawan y Joshi, 2017), la estimación semicuantitativa de la actividad enzimática de estas tres hidrolasas puede ser usada como indicador de alteraciones por la exposición a la radiación UV en las cepas irradiadas y adaptadas. Los resultados mostraron una actividad enzimática similar o incluso mayor en los aislados resistentes al TEB respecto a su cepa parental WT. A partir de los resultados, se puede inferir que a pesar de que existió una mayor variabilidad en la actividad lipolítica, se sugiere que las cepas mutadas por UV mantuvieron la misma virulencia que los aislados WT.

Evaluar la virulencia de los aislados de *A. lecanii* contra *C. viridis*, facilitó confirmar la suposición, ya que las cepas WT y UV mantienen una virulencia similar, excepto EH-348/2.2WTH; además, algunas cepas (EH-348/2.1UVH, EH-348/2.3UVK y EH-459UVH), mostraron una mortalidad cercana al 90 % en un menor tiempo en comparación con la cepa parental. Adicionalmente, al estimar el efecto micoparasitario de estos aislados sobre *Cladosporium* sp., permitió identificar que estos nuevos linajes son capaces de actuar como un micoparásito, donde las cepas EH-348/2.1, 2 y 3UVK y EH-459WT mostraron un mayor efecto. Adicionalmente, la resistencia al TEB en los nuevos linajes de *A. lecanii* no comprometió su capacidad micoparasítica. Donde en los aislados EH-348/2.1, 2.2 y 2.3UVK se registró una mayor actividad hiperparasitaria. Por otra parte, la reducción del crecimiento de *Cladosporium* en las concentraciones evaluadas del TEB sugiere un posible efecto sinérgico entre el fungicida y el micoparásito, donde el antifúngico afecta el crecimiento del fitopatógeno y facilita la colonización por *A. lecanii*.

Previamente se han generado experimentos para obtener cepas de *A. lecanii* resistentes a otros fungicidas, donde se emplearon múltiples rondas de radiación UV para inducir mutaciones. Los nuevos linajes generados mostraron además de resistencia, acortar el tiempo entre el asperjado de propamocarb y el uso del HE para el control biológico de áfidos en algodón (Xie *et al.*, 2018), permitiendo mostrar que, aunque un aislado mutante tenga una ligera resistencia al antifúngico, pueden sobreponerse al efecto negativo resultante de la aplicación del agroquímico. En el caso de las cepas EH-348/2 y EH-459 al ser sometidas a una sola ronda de mutagénesis UV y presión selectiva, mostraron resistencia y no tuvieron una diferencia en la virulencia entre las nuevas cepas y las WT, por lo que estas pueden ser empleadas en campo, donde se ha utilizado previamente el TEB.

Los resultados de esta investigación demuestran que, aunque *A. lecanii* presenta una alta susceptibilidad inicial al TEB, es posible generar linajes resistentes por medio de mutagénesis por radiación UV y presión selectiva, sin comprometer la aptitud de las cepas ni su virulencia al actuar como ACB como entomopatógeno, ni como micoparásito. Estas cepas resistentes representan una alternativa viable para su uso en agroecosistemas en los que se ha aplicado el fungicida, de forma que se amplían las posibilidades de añadir ACB en programas de manejo integrado de plagas. Asimismo, el modelo experimental utilizado constituye una plataforma para el estudio de procesos adaptativos en HE y para el desarrollo de cepas de acuerdo a las necesidades generadas por las condiciones del sistema donde se pretendan usar.

## 10. Conclusiones

La presencia de fungicidas en campo es un problema para la implementación de ACB fúngicos, de forma que se puede comprometer su establecimiento, reproducción y el efecto para controlar distintas plagas. Las cepas WT EH348/2 y EH-459 de *A. lecanii* mostraron una alta sensibilidad al TEB, por lo que su implementación en campo con presencia residual de TEB no tendría un efecto positivo. Pero su desarrollo en una concentración baja de 0.01 mg/l permitió el desarrollo de una estrategia para mejorar ambas cepas.

La implementación de radiación UV-C favoreció la aparición de mutaciones aleatorias en las cepas EH-348/2 y EH-459 que, en conjunto con una técnica de presión selectiva como la placa MEGA, favoreció el surgimiento de nuevos linajes resistentes al TEB, capaces de resistir concentraciones hasta 1000 veces superiores a las utilizadas en campo.

La generación de mutantes de HE como *A. lecanii* resistentes a TEB, abre la posibilidad para que sean utilizadas en sistemas agrícolas donde se implemente este fungicida de manera habitual, incluso en áreas donde fue asperjado, ya que al no observarse un costo de aptitud en los linajes UV en cuanto a crecimiento micelial, conidiación ni virulencia, estos pueden ser capaces de establecerse y competir en un ambiente natural.

El mejoramiento de cepas a partir de radiación UV y presión selectiva favorece el desarrollo de estrategias de manejo integrado más sostenibles y eficientes, que a su vez contribuyen a disminuir la dependencia de plaguicidas químicos, disminuir los efectos adversos que estos generan en el ambiente y la salud humana. Además de cambiar la forma de producción a una orgánica en un mediano o largo plazo. Adicionalmente, la modificación de la placa MEGA para ser utilizada en hongos filamentosos permite su adaptación a distintas cepas de HE para mejorar su potencial como ACB, bajo condiciones ambientales desafiantes.

## 11. Perspectivas

Los resultados del proyecto muestran que las cepas WT tienen la capacidad de adaptarse al TEB. Así como los linajes modificados mediante radiación UV y presión selectiva desarrollaron una resistencia a altas concentraciones de este fungicida. Sin embargo, es necesario desarrollar experimentos adicionales para comprender a profundidad los mecanismos de resistencia. Un primer acercamiento es la realización de cultivos sumergidos con TEB, de forma que se facilite la cuantificación del compuesto en el medio e identificar su posible degradación por parte de las cepas resistentes. Donde se podría dar un indicio si se presenta degradación enzimática del fungicida, sobreproducción de la proteína objetivo, modificación de la proteína objetivo o la expulsión del compuesto a través de bombas de eflujo. Así, el siguiente paso sería la identificación de mutaciones que confieren la resistencia, como las presentes en el CYP51 que codifica la 14  $\alpha$ -esterol desmetilasa; ATP-binding cassette y MFS (major facilitator superfamily) involucrados en la codificación de bombas de eflujo.

Para asegurar la estabilidad de las cepas resistentes como ACB, se deben realizar subcultivos sucesivos en medios sin fungicida y posteriormente, volverlos a exponer al TEB y verificar que no se afecte el crecimiento micelial ni la producción de conidios. Además de llevar a cabo pruebas de infectividad en invernadero y campo en distintos organismos hospederos, donde se deberán utilizar suspensiones de conidios con y sin TEB para confirmar la eficacia de las cepas como ACB en condiciones reales, el efecto sinérgico y analizar su interacción con otros factores bióticos y abióticos del entorno.

## 12. Literatura citada

Amini, S. N., H. Abbasipour, S. Aghajanzadeh, A. Zamani. 2010. First report of *Lecanicillium lecanii* and its sexual stage, from Iran. Iran Journal of Plant Pathology. 49; 279-280.

Anaduaka, E.G., Uchendu, N.O., Asomadu, R.O. 2023. Widespread use of toxic agrochemicals and pesticides for agricultural products storage in Africa and developing countries: Possible panacea for ecotoxicology and health implications. Heliyon. 9: e15173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15173>.

Anjaria, P., Vaghela, S. 2024. Toxicity of agrochemicals: impact on environment and human health. Journal of Toxicological Studies. 2: 250. <https://doi.org/10.59400/jts.v2i1.250>.

Ansari, A., Joshi, S., Amlathe, S. 2013. A sensitive and new colorimetric reagent system for the determination of 2-bromo-2-nitropropane 1,3-diol (bronopol) pesticide in grains and vegetables. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 5: 214-221. ISSN: 0975-1384.

Aragão, F.B., Duarte, I.D., Fantinato, D.E., Galter, I.N., Silveira, G.L., dos Reis, G.B., Andrade-Vieira, L.F., Matsumoto, S.T., 2021. Toxigenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. Ecotoxicol. Environ. Saf. 213, 111985 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111985>.

Araújo, M.F., Castanheira, E.M.S., Sousa, S.F. 2023. The buzz on insecticides; a review of uses, molecular structures, targets, adverse effects, and alternatives. Molecules. 28: 3641. <https://doi.org/10.3390/molecules28083641>.

Arce-Estrada, I., Legorreta-Díaz, M.C., Castillo-Cruz, R.A. 2025. (Des)empoderamiento de agricultores: riesgos para la salud y el ambiente por plaguicidas altamente peligrosos. Rev. Int. Contam. Ambie. 41: 137-150. <http://doi.org/10.20937/RICA.55217>.

Arora, N., Yen, H.W., Philippidis, G.P., 2020. Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts. Sustainability. 12, 5125. <https://doi.org/10.3390/su12125125>.

Asharf, S., M. Zuhair. 2013. Fungal biodiversity: a potential tool in plant disease management. 69-90. Capítulo 4. Springer. En: Malik, A., E. Grohmann, M. Alves. Management of microbial resources in the environment. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2_4).

Barnett, H.L. 1963. The nature of mycoparasitism by fungi. Annual Review of Microbiology 17: 1-14.

Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., Kishony, R., 2016. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. Science. 353, 1147–1151. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>.

- Behle, R., Birthisel, T., 2014. Formulations of entomopathogens as bioinsecticides. En: Morales-Ramos, J.A., Guadalupe Rojas, M., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Mass Production of Beneficial Organisms. Academic Press, New York, pp. 483–517. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822106-8.00010-5>.
- Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D.I., Adams, B.J. 2016. Biological control and nutrition: food for thought. *Biological Control*. 97: 131-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.007>.
- Boa, E., Danielsen, S., Haesen, S. 2015. Better together: Identifying the benefits of a closer integration between plant health, agriculture and one health. En J. Zinsstag, E. Schelling, D. Waltner-Toews, M. Whittaker, & M. Tanner (Eds.), *One health: The theory and practice of integrated health approaches* (pp. 53–64). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780643410.0258>.
- Boosalis, M.G. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*. 2: 363-376.
- Boss, C.J., 1987. Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Curr. Genet*. 12, 471–474. <https://doi.org/10.1007/BF00434826>.
- Bournaris, Th., Moulogianni, Ch., Arampatzis, S., Kiomourtzi, F., Wascher, D.M., Manos, B. 2016. A knowledge brokerage approach for assessing the impacts of the setting up Young farmers policy measure in Greece. *Environmental Impact Assessment Review*. 57: 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2015.12.004>.
- Braga, G.U.L., Rangel, D.E.N., Fernandes, E.K.K., Flint, S.D., Roberts, D.W. 2015. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. *Curr. Genet*. <http://doi.org/10.1007/s00294-015-0483-0>.
- Brepoels, P., De Wit, G., Lories, B., Belpaire, T.E., Steenackers, H.P. 2024. Selective pressure for public antibiotic resistance. *Crit. Rev. Microbiol*. 51: 417-426. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2367666>.
- Burns, P.A., Allen, F.L., Glickman, B.W. 1986. DNA sequence analysis of mutagenicity and site specificity of ethyl methanesul-fonate in Uvr+ and UvrB- strains of *Escherichia coli*. *Genetics*.113:811–819. <https://doi.org/10.1093/genetics/113.4.811>.
- Canjura-Saravia, E.M., V. Sánchez-Garita, U. Krauss, E. Somarriba. 2002. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 66; 13-19.
- Cano, A.V., Gitschlag, B.L., Rozhoňová, H., Stoltzfus, A., McCandlish, D.M., Payne, J.L. 2023. Mutation bias and the predictability of evolution. *Philos Trans Royal Soc B: Biol Sci* 378:20220055.

Cárdenas-Murillo, R. 1993. Control biológico de plagas. Avances técnicos 189. CENICAFE, Chinchiná, Caldas, Colombia. p4.

Castellanos-González, L., Lorenzo, M.E., Muiño, B.L., Hernández, R., Guillen, D., López, V. 2012. Effect of six fungicides on *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* (Zimm.) Zare & Gams. Journal of Food, Agriculture & Environment. 10: 1142-1145.

Castellanos-González, L., Muiño-García, B.L., Lorenzo-Nicao, M.E., Rodríguez-Fernández, A., Gómez, M., 2011. Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Fitosanidad 15, 31-38. ISSN 1818-1686.

Castellanos-Moguel, J., Gonzales-Barajas, M., Mier, T., Reyes-Montes, Ma.R., Aranda, E., Toriello, C., 2007. Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). Rev. Iberoam. Micol. 24, 62–68. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(07\)70016-5](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(07)70016-5).

Castrillo, L.A., Roberts, D.W., Vandenberg, J.D. 2005. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. Journal of Invertebrate Pathology. 89: 46-56. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.005>.

Chen, S.N., Luo, C.X., Hu, M.J., Schnabel, G. 2016. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* isolates with resistance to multiple chemical classes of fungicides. Phytopathology 106:997–1005.

Chen, Y., Zhang, Y., Yao, J., Li, Y.F., Yang, X., Wang, W.X., Zhang, A.F., 2013. Frequency distribution of sensitivity of *Ustilaginoidea virens* to four EBI fungicides, prochloraz, difenoconazole, propiconazole and tebuconazole, and their efficacy in controlling rice false smut in Anhui Province of China. Phytoparasitica. 41, 277–284. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0288-y>.

Cheng, P., Liu, F., Wu, Sh., Xiao, W., Zong, Q., Liu, T., Peng, Y. 2025. Impact of Tebuconazole on the development and symbiotic microbial communities of *Pardosa pseudoannulata*. Microbial Ecology. 88-97. <http://doi.org/10.1007/s00248-025-02600-6>.

Cobb, R. E., Sun, N., Zhao, H. 2013. Directed evolution: Past, present and future. *Current Opinion in Chemical Biology*. 59: 1432-1444. <http://doi.org/10.1002/aic.13995>.

Crofton, K.M., 1996. A structure-activity relationship for the neurotoxicity of triazole fungicides. Toxicol. Lett. 84, 155–159. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03618-0](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03618-0).

- Cui, N., He, Y., Yao, S.h., Zhang, H., Ren, J., Fang, H., Yu, Y., 2019. Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil. *Sci. Total Environ.* 648, 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.247>.
- Damicone, J, 2016. Fungicide resistance management. Oklahoma cooperative extension fact sheets EPP–7663. Division of agricultural sciences and natural resources, Oklahoma State University. <https://extension.okstate.edu/fact-sheets/print-publications/epp-entomology-and-plant-pathology/fungicide-resistance-management-epp-7663.pdf>. (accessed 29 January 2023).
- Deising, H.B., Reimann, S., Pascholati, S.F. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Braz. J. Microbiol.* 39: 286-295. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220080002000017>.
- Dhawan, M., Joshi, N., 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Braz. J. Microbiol.* 48, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.004>.
- Dorigan, A.F., de Carvalho, G., Poloni, NM., Begrisoli, M.M., Maciel, J.L.N., Ceresini, P.C., 2017. Resistance to triazole fungicides in *Pyricularia* species is associated with invasive plants from wheat fields in Brazil. *Acta Scientiarum* 41, 2-10 <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v41i1.39332>.
- Eskes, A., M. Mendes, C. Robbs, 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptoctrum* *Café Cacao Thé* 35: 275-282.
- Fan, Z., Yang, J.H., Fan, F., Luo, C.X., Schnabel, G. 2015. Fitness and competitive ability of *Alternaria alternata* field isolates with resistance to SDHI, Qol, and MBC fungicides. *Plant Dis* 99:1744–1750. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0354-RE>.
- FAO. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2019. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Roma, FAO.
- FAO. 2020. Año Internacional de la Sanidad Vegetal (AISV) 2020: Sanidad vegetal y seguridad alimentaria. Roma.
- FAO. 2022. FAO’s plant production and protection división. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2447en>
- FAO. 2023. Pesticides use and trade, 1990–2021. FAOSTAT Analytical Briefs Series No. 70. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc6958en>
- FAO. 2025. Pesticides use and trade – 1990–2023. FAOSTAT Analytical Briefs, No. 109. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd5968en>

Faria-Ramos, I., Farinha, S., Neves-Maia, J., Riveiro-Tavares, P., Miranda, I.M., Estevinho, L.M., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., 2014. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol.* 14, 155. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-155>.

Fisher, K.J., Lang, G.I. 2016. Experimental evolution in fungi: an untapped resource. *Fungal Genetics and Biology.* 94: 88-94. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.06.007>.

[Fletcher, J., Franz, D., LeClerc, J.E. 2009. Healthy plants: necessary for balanced 'One Health' concept. \*Veterinaria Italiana.\* 45: 79-95.](#)

Fones, H. N., Eyles, C. J., Kay, W., Cowper, J. Gurr, S. J. 2017. A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet. Biol.* 106, 51–60. <http://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>.

Galvão, J.A.H., Bettioli, W. 2014. Effects of UV-B radiation on *Lecanicillium* spp., biological control agents of the coffee leaf rust pathogen. *Tropical Plant Pathology.* 39: 392-400.

Gambhir, N., Kamvar, Z.N., Higgins, R., Amaradasa, B.S., Everhart, S.E., 2020. Spontaneous and fungicide-induced genomic variation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology.* 111, 160–169. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-20-0471-FI>.

Gao, H., Luo, Y., Li, Q., Guo, J., Wang, B. 2025. UV-Induced Mutants of *Metarhizium anisopliae*: Improved Biological Parameters, Resistance to Stressful Factors, and Comparative Transcriptomic Analysis. *J. Fungi.* 11, 412. <https://doi.org/10.3390/jof11060412>.

García-Nevárez, G., Hidalgo-Jaminson, E., 2019. Efficacy of indigenous and commercial *Simplificillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*. *Mexican Journal of Ohytopathology* 37, 247-250 <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-4>.

García-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., 2017. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. *Drugs.* 77, 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>.

García-Rubio, R., Gonzalez-Jimenez, I., Lucio, J., Mellado, E., 2019. *Aspergillus fumigatus* cross-resistance between clinical and demethylase inhibitor azole drugs. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.02539-20>.

Goettel, M.S., Koike, M., Kim, J.J., Aiuchi, D., Shinya, R., Brodeur, J., 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009>.

González, E., M. Surís, 2007. Selección in vitro de aislamientos promisorios de *Lecanicillium lecanii* (Zare y Gams) para la lucha biológica de *Hemileia vastatrix* (Berk et Br.). Revista Protección Vegetal 22: 128-130.

Gresham, D., Dunham, M.J. 2014. The enduring utility of continuous culturing in experimental evolution. Genomics. 104: 399-405. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.09.015>.

H. Congreso de la Unión, Cámara de Diputados, 2022. Ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Diario oficial de la Federación, May 11, 2022. <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf> (accessed 29 January 2023). <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>. (accedido el 29 de enero de 2023).

Hammok, N.S., Al-rawo, J.M.S. 2021. Mutagenic effect of ultra violet (UV-C) on living organisms. Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics. 14: 16-20.

Hankin, L., Agnostakis, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 67, 597–607. <https://doi.org/10.2307/3758395>.

Harish, E., Osherov, N., 2022. Fungal Priming: Prepare or Perish. J Fungi (Basel) 8(5):448. <https://doi.org/10.3390/jof8050448>.

Hawkins, N.J. 2024. Assessing the predictability of fungicide resistance evolution through *in vitro* selection. Journal of Plant Diseases and Protection. 131: 1257-1264. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00906-0>.

Hegedus, D., Khachatourians, G., 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Rev. Biotechnol. Adv. 13, 455–490. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02006-o](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02006-o).

Hossain M.E., Shahruk, Hossain, S.A. 2022. Chemical Fertilizers and Pesticides: Impacts on Soil Degradation, Groundwater, and Human Health in Bangladesh. 63-92. [http://doi.org/10.1007/978-3-030-95542-7\\_4](http://doi.org/10.1007/978-3-030-95542-7_4).

Hsu, S.C., Lockwood, J.L., 1975. Powdered chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Appl. Environ. Microbiol. 29, 422–426. <https://doi.org/10.1128/am.29.3.422-426.1975>.

Ikehata, H., Ono, T. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. J. Radiat. Res. 52: 115-125. <http://doi.org/10.1269/jrr10175>.

- Inceoglu A.B., Kamita, S.G., Hammock, B.D., 2006. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv. Virus Res.* 68:323–360. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68009-3).
- Jackson, D., K. Zemenick, G. Huerta, 2012. Occurrence in the soil and dispersal of *Lecanicillium lecanii*, a fungal pathogen of the Green coffee scale (*Coccus viridis*) and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15: 389-401.
- Jankielsohn, A. 2018. The importance of insects in agricultural ecosystems. *Advances in Entomology*. 6: 62–73. <https://doi.org/10.4236/ae.2018.62006>.
- Jeanvoine, A., Rocchi, S., Bellanger, A.P., Reboux, G., Millon, L., 2020. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment? *Med. Mal. Infect.* 50, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.07.014>.
- Jiang, X., Mu, B., Huang, Z., Zhang, M., Wang, X., Tao, S., 2010. Impacts of mutation effects and population size on mutation rate in asexual populations: a simulation study. *BMC Evol. Biol.* 10, 298. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-298>.
- Karlsson, M., Durling, M.B., Choi, J., Kosawang, Ch., Lackner, G., Tzelpis, G.D., Nygren, K., Dubey, M.K., Kamou, N., Levasseur, A., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D.B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A.L., Pöppeler, S., Vannacci, G., Collinge, D.B., Hoffmeister, D., Henrissat, B., Lee, Y., Jensen, D.G. 2015. Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome. Biol. Evol.* 8: 465-480. <http://doi.org.10.1093/gbe/evu292>.
- Kaur, T., Sinha, A.K. 2019. Pesticides in Agricultural Run Offs Affecting Water Resources: A Study of Punjab (India). *Agricultural Sciences*. 10: 1381-1395. <http://doi.org/10.4236/as.2019.1010101>.
- Kemoi, E.K., Nyerere, A., Bii, C.C., 2018. Triazole-resistance *Aspergillus fumigatus* from fungicide-experienced soil in Naivash Subcounty and Nairobi County. Kenya. *Int. J. Microbiol.* 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/7147938>.
- Kepler, R.M., Luangsa-ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Alisha, C., Sungo, G., Rehner, S.A., Aime, M.C., Henkel, T.W., Sanjuan, T., Zare, R., Chen, M., Li, Z., Rossman, A.Y., Spatafora, J.W., Shrestha, B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (Hypocreales). *IMA Fungus*. 8: 335-353. ISSN: 2210-6359.

- Khan, S., Bagwan, N.B., Iqbal, S.F., Iqbal, M.A. 2012. *In vitro* compatibility of two entomopathogenic fungi with selected insecticides, fungicides and plant growth regulators. Libyan Agriculture Research Center Journal International. 3: 36-41. ISSN 2219-4304.
- Kim, J.J., K.Ch. Kim, D.W. Roberts, 2005. Impact of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on development of an aphid parasitoid, *Aphidius colemani*. Journal of Invertebrate Pathology 88: 254-256.
- Klix, M.B., Verreet, J.A., Beyer, M., 2007. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. Crop Protect. 26, 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.006>.
- Koenraadt C.J.M., Takken, W., 2011. Viability of GM fungi crucial to malaria control. Science, 332(6026), 175 pp. <https://doi.org/10.1126/science.332.6026.175>.
- Kohn, L.M., Schaffer, M.R., Anderson, J.B., Grunwald, N.J. 2008. Marker stability throughout 400 days of *in vitro* hyphal growth in the filamentous ascomycete, *Sclerotinia sclerotiorum*. Fungal Genetics and Biology. 45:613-617. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.09.013>.
- Kolář, M., Urbánek, K., Látal, T. 2001. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 17: 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00317-X).
- Larsen, B., Poulsen, B.R., Eriksen, N.T., Iversen, J.J.L. 2004. Homogeneous batch cultures of *Aspergillus oryzae* by elimination of wall growth in the Variomixing bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology. 64:192-198. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1437-x>.
- Leadbeater, A. 2015. Recent developments and challenges in chemical disease control. Plant. Protect. Sci. 51: 163-169. <http://doi.org/10.17221/83/2015-PPS>.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. Hum. Ecol. Risk Assess. 22, 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.
- Lichtemberg, P.S.F., Luo, Y., Morales, R.G., Muehlmann-Fischer, J.M., Michailides, T.J., De Mio, L.L.M., 2017. The point mutation G461S in the MfCYP51 Gene is associated with tebuconazole resistance in *Monilinia fructicola* populations in Brazil. Phytopathology. 107, 1507–1514. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0050-R>.
- Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V., Alberola, C., & Wallach, D. 2009. Sustainable agriculture. Volume 1. Springer. <http://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8>.

- Litwin, A., Nowak, M., Rózsalska, S., 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19, 23–42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>.
- López, M. 1990. Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café. C.R. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. p87.
- Lucas, J.A., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2015. Chapter Two-The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>.
- Maggi, T.C., Chreil, R. 2023. Toxicidad de pesticidas para insectos polinizadores. *Polinizadores de cultivos*. 5: 33-42. <http://doi.org/10.13140/RG.2.2.10772.48007>.
- Maheswari, M., Yadav, S.K., Shanker, A.K., Kumar, M.A., Venkateswarlu, B. 2011. Overview of plant stresses: mechanisms, adaptations and research pursuit. In: Venkateswarlu, B., Shanker, A., Shanker, C., Maheswari, M. (eds) *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0_1).
- Malandrakis, A.A., Apostolidou, Z.A., Markoglou, A., Flouri, F., 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *Eur J Plant Pathol.* 142, 489-499 <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>.
- Malik, Z., Ahmad, M., Abassi, G.H. 2017. Agrochemicals and soil microbes: Interaction for soil health. En: Hashmi MZ, Kumar V, Varma A (Eds.). *Xenobiotics in the Soil Environment*. Springer. pp. 139-152. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2\\_117](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47744-2_117).
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., 2020. Impact of agrochemicals on soil health. En: Prasad MNV (editor). *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers*. Butterworth-Heinemann. pp. 161-187. <http://doi.org/10.1016/b978-0-08-103017-2.00007-6>.
- Mannino, M.C., Huarte-Bonnet, C., Davyl-Colo, B., Pedrini, N. 2019. Is the insect cuticle the only entry gate fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi*. 5:33. <http://doi.org/10.3390/jof5020033>.
- Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., Eliopoulos, P.A. 2022. Entomopathogenic fungi: interactions and applications. *Encyclopedia*. 2: 646-656. <http://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>.
- Margyar, D., Vass, M., Li, D. 2016. Dispersal strategies of microfungi. In: *Biology of microfungi. Fungal biology*. Pp. 315-371. [http://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6\\_14](http://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_14).

- Marzano, M., Gallo, A., Altomare, C., 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* ssp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biol. Control*. 67, 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.008>.
- Mascarin, G., Shrestha, S., De Carvalho, M.V., Ramires, J.L., Dunlap, Sh.A., Coleman.J.J. 2024. CRISPR-Cas9-mediated enhancement of *Beauveria bassiana* virulence with overproduction of oosporein. *Fungal Biology and Biotechnology*. 11:21. <https://doi.org/10.1186/s40694-024-00190-5>.
- Mascarin, G., Shrestha, S., Dunlap, Ch.A., Ramirez, J.L., Coleman, J.J. 2025. Enhanced virulence through genetic engineering of *Beauveria bassiana* blastospores by overexpression of a cuticle-degrading endochitinase. *Journal of Invertebrate Pathology*. 108420. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2025.108420>.
- Massi, F., Torriani, S.F.F., Borghi, L., Toffolatti, S.L. 2021. Fungicide resistance evolution and detection in plant pathogens: *Plasmopara viticola* as a case study. *Microorganisms*. 9: 119. <http://doi.org/10.3390/microorganisms9010119>.
- Mehmood, A., Amin, A., Majeed, K., Sufyan, M., Fayyaz, M., Zakria, M. 2025. An overview of economic important fungal diseases of Wheat: Causal organism; etiology; life cycle; management. *Planta Animalia*. 4: 165-178. <http://doi.org/10.71454/PA.004.02.0048>.
- Mier, T., F. Rueda, J. Bermudez, Y. Dominguez, C. Benavides, M. Ulloa.1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad in vitro sobre este insecto. *Revista Mexicana de Micología*. México. 7; 149-165.
- Mier, T., Toriello, C., Ayala-Zermeño M.A., Navarro-Barranco H. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. CUADERNO 51. CBS UAM-Xochimilco. 39 p. Distrito Federal, México
- Mikaberidze, A., and McDonald, B. A. 2015. Fitness cost of resistance: Impact on management. Pages 77-89 in: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. H. Ishii and D. W. Hollomon, eds. Springer Japan, Tokyo, Japan.
- Mikaberidze, A., Paveley, N., Bonhoeffer, S., Van Den Bosch, F. 2017. Emergence of resistance to fungicides: the role of fungicide dose. *Phytopathology* 107:545–560.
- Miranda-Hernández, F., Garza-López, P.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>.

- Miranda-Hernández, J.F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., Loera O., 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Sci.* 70, 661–666. ISSN: 1526-498X. <https://doi.org/10.1002/ps.3605>.
- Mondal, S., Baksi, S., Koris, A., Vatai, G. 2016. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering.* 2: 85-99. <http://doi.org/10.1016/j.psra.2016.10.001>.
- Money, N.P. 2016. Chapter3 – Spore Production, discharge, and dispersal. In: *The fungi.* (3 ed). Academic press. Pp 67-97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00003-7>.
- Moricca, S., A. Ragazzi. 2008. Biological and integrated means to control rust diseases. En: Ciancio, A., K.G. Mukerji (Eds.). *Integrated Management of diseases caused by fungi, Phytoplasma and bacteria.* Springer Science+Business Media B.V.
- Muñiz-Paredes F., Miranda-Hernández F., Loera O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 33:57. ISSN: 1573-0972 (electronic version). DOI: 10.1007/s11274-017-2229-2.
- Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C., 2011. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology & Biochemistry.* 43, 2176–2183. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.001>.
- Navarro, S., Vela, N., Navarro, G., 2011. Fate of triazole fungicide residues during malting, mashing and boiling stages of beermaking. *Food Chem.* 124, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.033>.
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N.O., 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi *versus* the insect cuticle. *Insects.* 4, 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>.
- Pal, K.K., McSpadden, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor.* 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Park, H.S., Yu, J.H., 2012. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.006>.
- Patil, V.K., Wagh, U.B., Phalak, R.P., Bhirud, J.D., Narkhede, H.P. 2022. A novel validated simple derivatization liquid chromatographic method with diode array mancozeb, azoxystrobin and difenoconazole in pesticide dosage form. *Analytical Methods.* 14: 907. <http://doi.org/10.1039/d1ay01926k>.

- Pereira, W.V., Morales, R.G.F., Bauer, A.I.G., Kudlawiec, K., May-De-Mio, L.L., 2019. Discontinuance of tebuconazole in the field restores sensitivity of *Monilia fruticola* in stone fruit orchards. *Plant Pathol.* 69, 1–9. <https://doi.org/10.1111/ppa.13101>.
- Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G.S., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2015. Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag. Sci.* 71, 1054–1058. <https://doi.org/10.1002/ps.4029>.
- Quesada-Moraga, E., Garrido-Jurado, I., González-Mas, N., Yousef-Yousef, M. 2023. Ecosystem services of entomopathogenic ascomycetes. *Journal of Invertebrate PATHology.* 108015. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2023.108015>.
- Rachmayati, R., Agustriana, E., Rahman, D.Y. 2020. UV mutagenesis as a strategy to enhance growth and lipid productivity of *Chlorella* sp. 042. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology.* 3: 218-227. <http://doi.org/10.22146/jtbb.56862>.
- Rai, D., Updhyay, V., Mehra, P., Rana, M., Pandey, A.K., 2014. Potential of entomopathogenic fungi as biopesticides. *Ind. J. Sci. Res. and Tech.* 2, 7–13. ISSN:-2321-9262.
- Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Megharaj, M., 2019. Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Sci. Total Environ.* 654, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.041>.
- Ramos, Y., Taibo, A.D., D’Alessandro, C.P. 2022. Effect of synthetic pesticides on conidial germination and endophytic activity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in common vean plants. *Chilean J. Agric. Amin. Sci.* 38: 199-206. <https://doi.org/10.29393/CHJAA38-19ESYC30019>.
- Rangel, D.E., Dettenmaier, S.J., Fernandes, E.K.K., Roberts, D.W., 2010. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. *Biocontrol Sci. Technol.* 20, 275–389. <https://doi.org/10.1080/09583150903518370>.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U., Flint, S.D., Anderson, A.J., Roberts, D.W. 2004. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produce don insects and artificial substrates. *J. Invertebr. Pathol.* 87: 77-83. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2004.06.007>.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Fernandes, E.K.K., Keyser, Ch.A., Hallsworth, J.E., Roberts, D.W. 2015. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Curr. Genet.* 61: 383-404. <http://doi.org/10.1007/s00294-015-0477-y>.

- Reddy, D.S., Reddy, M.L.N., Pushpalatha, M., 2018. Interaction of fungicides with bio-control agents. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6, 454–551. E-ISSN: 2320-7078.
- Ren, J., Jin, X., Zhang, Q., Zheng, Y., Lin, D., Yu, Y., 2017. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *J. Hazard Mater.* 326, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.013>.
- Rizzo, D.M., Lichtveld, M., Mazet, J.A.K., Togami, E., Miller, S.A., 2021. Plant health and its effects on food safety and security in a one health framework: four case studies. *One Health Outlook*. 3, 6. <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00038-7>.
- Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas, R., Viniestra-González, G., Loera, O., 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.007>.
- Rossetti, M.F., Stoker, C., Ramos, J.G. 2020. Agrochemicals and neurogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 510: 110820. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110820>.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasoulzadeh, G.R., Bandani, A.R., Butt, T.M., 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>.
- Said, M. 2023. An Overview of Impact of Agrochemicals on Human Health and Natural Environment. *Scientific Research Communications*. 3: 32-39. <http://doi.org/10.52460/src.2023.009>.
- Salazar-Cerezo, S., Vries, R.P., Garrigues, S. 2023. Strategies for the development of industrial fungal producing strains. *Journal of Fungi*. 9: 834. <http://doi.org/10.3390/jof9080934>.
- Sánchez-Torres, P. 2021. Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in citrus postharvest Green mold. *J. Fungi. (Basel)*. 7: 783. <http://doi.org/10.3390/jof7090783>.
- Shah, F.A., Ansari, M.A., Watkins, J., Phelps, Z., Cross, J., Butt, T.M., 2009. Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Technol* 19, 743–753. <https://doi.org/10.1080/09583150903100807>.
- Shapiro-Ilan, D.I., Reilly, Ch.C., Hotchkiss, M.W., Wood, B.W. 2002. The potential for enhanced fungicide resistance in *Beauveria bassiana* through strain discovery and artificial selection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2: 86-93. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00151-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00151-9).

- Sharma, L., Bohra, N., Rajput, V. D., Quiroz-Figueroa, F. R., Singh, R. K., Marques, G. 2021. Advances in entomopathogen isolation: A case of bacteria and fungi. *Microorganisms*, 9(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>.
- Sharpe, A.R., Lagrou, K., Meis, J.F., Chowdhary, A., Lockhart, S.R., Verweij, P.E., 2018. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 1, 83–92. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx144>.
- Shavanov, M.V., Shigapov, I.I., Niaz, A. 2022. Biological methods for pests and diseases control in agricultural plants. *AIP Conf. Proc.* 2390; 030081. <https://doi.org/10.1063/5.0070487>.
- Shin, T.Y., Lee, M.R., Park, S.E., Lee, S.J., Kim, W.J., Kim, J.S., 2020. Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 105, e21747 <https://doi.org/10.1002/arch.21747>.
- Shinde, S.V., K.G. Patel, M.S. Purohit, J.R. Pandya, A. M. Sabalpara. 2010. *Lecanicillium lecanii* (Zimm) Zare and Games an important biocontrol agent for the management of insect pests – a review. *Agricultural Review* 31; 235 – 252.
- Shivani D., J.S. Kumar. 2015. Extracellular enzymatic profile of fungal detriogens of historical palace of Ujjain. *Int. J Curr. Microbiol. App. Sci.* 4: 122-132.
- Siek, M., Pazko, T., 2019. Factors affecting coupled degradation and time-dependent sorption processes of tebuconazole in mineral soil profiles. *Sci. Total Environ.* 690, 135–1047. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.409>.
- Sierotzki, H., Scalliet, G., 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology.* 103, 880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>.
- Singh, B. K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J. E., Liu, H., Trivedi, P. 2023. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*, 21(10), 640–656. <http://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>.
- Soares, D., Silve, L., Duarte, S., Pena, A., Pereira, A. 2021. Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. *Foods.* 10: 2785. <https://doi.org/10.3390/foods10112785>.
- Song, Z.H., Nes, W.D., 2007. Sterol biosynthesis inhibitors: potential for transition state analogs and mechanism-based inactivators targeted at sterol methyltransferase. *Lipids.* 42, 15–33. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3017-1>.

Sridhar, N., Baskaran, J., Thangapandiyan, S., Dhanasekaran, S., Vasantharaja, D., Mahesh babu, S. 2015. Bromadiolone-Second generation anticoagulant rodenticide induced nephrotoxicity on lesser bandicoot rat *Bandicota bengalensis* (Gray and Hardwicke). *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 03: 13-21.

St. Leger R.J., L. Joshi, M.J. Bidochka, D.W. Roberts, 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*, 93: 6349-6354.

St. Leger, R.J., Wang, Ch. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:901-907. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2306-z>.

Stoner, K., 2004. Approaches to the biological control of insects. *Sustainable Agriculture. Northeast Region SARE. UMCE Bulletin 7144*.

Strickland, T., Potter, T.L., Joo, H., 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Management Science* 60: 703-709. <https://doi.org/10.1002/ps.860>.

Sun, Y., Zhang, B., Zhang, W., Wang, Q., Toufeeq, Sh., Rao, X. 2023. UV-induced mutagenesis of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) yields two hypervirulent isolates with different transcriptomic profiles. *Pest. Manag. Sci.* 79: 2762-2779. <http://doi.org/10.1002/ps.7452>.

Suprapta D.N., 2012. Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 18, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.

Suthaparan A, Pathak R, Solhaug KA, Gislerød HR. 2018. Wavelength dependent recovery of UV-mediated damage: tying up the loose ends of optical based powdery mildew management. *J. Photochem. Photobiol. B* 178:631–40. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.018>.

Tian, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22, 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera, O., 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. 169, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>.

Umetsu, N., Shirai, Y. 2020. Development of novel pesticides in the 21st century. *J. Pestic. Sci.* 45: 54-74. <http://doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>.

- Valero-Jiménez, C.A., van Kan, J.A.L., Koenraadt, C.J.M., Zwann, B.J., Schoustra, S.E. 2016. Experimental evolution to increase the efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes: effects on mycelial growth and virulence. *Evolutionary Applications*. 10: 433-443. <https://doi.org/10.1111/eva.12451>.
- Van den Bergh B., Swings T., Fauvart M., Michiels J. 2018. Experimental design, population dynamics, and diversity in microbial experimental evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 82(3):10–1128. <https://doi.org/10.1128/membr.00008-18>.
- Vandermeer, J., I. Perfecto, H. Liere, 2009. Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant pathology* 58: 636-641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02067.x>.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., Blackwell, M. 2012. Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L.A., Jackson, M.A., 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*. 143, 33–46. <https://doi.org/10.1023/A:1006962808712>.
- Vivekanandhan, P., Swathy, K., Lucy, A., Sarayut, P., and Patcharin, K. 2023. Entomopathogenic fungi based microbial insecticides and their physiological and biochemical effects on *Spodoptera frugiperda* (JE smith). *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 13:1254475. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1254475>.
- Wang, C.S., St. Leger, R.J., 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nat. Biotechnol*. 25, 1455–1456. <https://doi.org/10.1038/nbt1357>.
- Witten, J.T., Chen, C.T., Cohen, B.A. 2007. Complex genetic changes in strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived by selection in the laboratory. *Genetics*. 177:49-456. <http://doi.org/10.1534/genetics.107.077859>.
- Xie, M., Li, Q., Hu, X.P., Zhang, Y.J., Peng, D.L., Li, Q., Liu, Z.Q., Zhang, Z.R., 2018. Improvement of the propamocarb-tolerance of *Lecanicillium lecanii* through UV-light radiation-based mutagenesis. *Crop Prot*. 103, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.09.014>.
- Yang, G., Cui, S., Ma, N., Song, Y., Ma, J., Huang, W., Zhang, Y., Xu, J., 2022. Genetic structure and triazole antifungal susceptibilities of *Alternaria alternata* from greenhouses in Kunming, China. *Microbiol. Spectr*. 10 <https://doi.org/10.1128/spectrum.00382-22>.

Yoshida, Y., Aoyama, Y., 1987. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P- 45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 36, 229–235. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90694-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90694-0).

Zapata-Narváez, Y.A., Botina-Azain, B.L. 2023. Effect of adjuvants, fungicides and insecticides on the growth of *Trichoderma* Th003. *Mexican Journal of Phytopathology.* 41: 412-433. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-1>.

Zare, R., W. Games. 2003. IMI Descriptions of fungi and bacteria: *Lecanicillium lecanii*. Center for Agricultural Bioscience International. 157; 1565.

Zhang, J., Heuvel, J., Debts, A.J.M., Verweij, P.E., Melchers, W.J.G., Zwan, B.J., Schoustra, S.E., 2017. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proc. Biol. Sci.* 284, 20170635. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0635>.

Zhao, S.L., Minmin, S.-G.J., Tian, J., Chen, J., Dai, X., Kong, Z., 2022. Impact of chiral tebuconazole on the flavor components and color attributes of Merlot and Cabernet Sauvignon wines at the enantiomeric level. *Food Chem.* 373, 131577 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131577>.

Zheng, F., Li, L., Xiao, X., Chen, Y., Tang, J., Li, Ch., Huang, J., Zhang, Ch., Yang, T., Xu, J., Maharachchikumbura, S.S.N., Jiao, Ch., Xie, Y., Li, H. 2025. Species diversity of *Cladosporium* in *Citrus* and the genetic mechanisms for *C. cladosporioides* complex to adapt broad host plants. *Fungal Diversity.* 133: 1-22. <https://doi.org/10.1007/s13225-025-00559-w>.

Zhou, W., Arcot, Y., Medina, R.E., Bernal, J., Cisneros-Zevallos, Akbulut, M.E.S. 2024. Integrated pest management: an update on the sustainability approach to crop protection. *ACS Omega.* 9: 41130-41147. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06628>.

Zoltkin, E., Fishman, Y., Elzar, M. 2000. AaIT: from neurotoxin to insecticide. *Biochimie*, 82: 869-881. [http://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01177-9](http://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01177-9).

Zubrod, J.P., Bundschuh, M., Artes, G., Brühl, C., Imfled, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J.J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schultz, R., Schäfer, R.B. 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environ Sci Technol.* 53: 3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est8b04392>.



### 13. Anexo

Miranda-Calixto, A., Loera-Corral, O., López-Pérez, M., Figueroa-Martínez, F., 2023. Improvement of *Akanthomyces lecanii* resistance to tebuconazole through UV-C radiation and selective pressure on microbial evolution and growth arenas. *Journal of Invertebrate Pathology*. 198: 107914. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107914>

Journal of Invertebrate Pathology 198 (2023) 107914



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)



Improvement of *Akanthomyces lecanii* resistance to tebuconazole through UV-C radiation and selective pressure on microbial evolution and growth arenas

Arturo Miranda-Calixto<sup>a</sup>, Octavio Loera-Corral<sup>a</sup>, Marcos López-Pérez<sup>b</sup>,  
Francisco Figueroa-Martínez<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C. P. 09340 CDMX, Mexico

<sup>b</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma Departamento de Ciencias Ambientales, Av. de las Garzas 10, El panteón, C. P. 52005 Lerma de Villada, Mexico

<sup>c</sup> CONACyT Research Fellow - Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C. P. 09340 CDMX, Mexico



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00304

Matrícula: 2183802095

Resistencia a Tebuconazol en cepas de *Akanthomyces lecanii* a partir de radiación UV y presión selectiva en Arenas de Crecimiento y Evolución Microbiana.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 10 del mes de abril del año 2026 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO  
DR. MARCOS LOPEZ PEREZ  
DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ  
DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

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

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: ARTURO ENRIQUE MIRANDA CALIXTO

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

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
  
DRA. EDITH ARENAS RIOS

PRESIDENTA  
  
DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO

VOCAL  
  
DR. MARCOS LOPEZ PEREZ

VOCAL  
  
DRA. FLOR DE MARIA CUERVO LOPEZ

SECRETARIO  
  
DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO