

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS, UTILIZANDO COMO MODELO LARVAS
DE *Galleria mellonella*

DUSTIN A. MORENO S.

4-788-1449

DAVID, CHIRIQUÍ

REPUBLICA DE PANAMÁ

2020

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS, UTILIZANDO COMO MODELO LARVAS
DE *Galleria mellonella*

TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDA PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO EN CULTIVOS
TROPICALES

PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

APROBADO:

DR. ALEX RÍOS MORENO

DIRECTOR

MSC. GLADYS I. GONZÁLEZ DUFUO

ASESOR

MSC. ZYDDI VISSUETTI

ASESOR

DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020

AGRADECIMIENTOS:

Mi mayor agradecimiento se dirige a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, el que en todo momento está conmigo ayudándome a aprender de mis errores para no cometerlos otra vez y sobre todo por darme esta hermosa familia que ha creído en mí dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

Me gustaría agradecerle al Dr. Alex Ríos por su constante apoyo, asesoramiento, esfuerzo, paciencia y por todos esos conocimientos transferidos constantemente a lo largo de esta investigación y sobre todo por confiar en mí desde el primer día.

Gracias a la Dra. Gladys González, las Ing. Kathia Castrejon y Sindy Caballero por su gran ayuda y conocimientos brindados en todo este tiempo en el laboratorio de entomología agrícola del IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá) (David-Coquito). A mis profesores del departamento de protección vegetal, por su valiosa ayuda y colaboración en este trabajo de investigación. A los profesores, el Dr. Reynaldo Vargas, Reggie Guerra, Joseph Grajales y Ziddy Visuetti por sus constantes consejos y colaboración en la parte estadística de esta investigación.

Un especial agradecimiento a las instituciones SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación) por financiar, creer y darme la oportunidad de ejecutar este proyecto investigativo a través de la convocatoria Nuevos Investigadores 2019 Ronda I. A las autoridades los Msc. Eldis Barnes y Simón

Vásquez y al cuerpo administrativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá gracias por su gran apoyo.

Al IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá) quiero darles un agradecimiento muy especial por aceptarme en sus instalaciones y brindarme su apoyo en todo lo necesario a pesar de las circunstancias difíciles del Covid-19.

A la Lic. Ana Moreno, por su ayuda constante en la crianza y biología del insecto.

Al Grupo Calesa, por abrirnos sus puertas y brindarnos su apoyo en la metodología de crianza del insecto.

Finalmente agradecer al señor Luis Miranda encargado del proyecto apícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá por brindarnos las colmenas con muestras de *Galleria Mellonella*.

DEDICATORIA:

Esta tesis se la dedico a Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y que su mano de fidelidad y amor han estado conmigo hasta el día de hoy.

Un especial agradecimiento a mi abuela Elizabeth Samudio que junto a mí abuelo Carlos Vásquez con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades porque Dios está conmigo en todo momento, por siempre escucharme y orientarme por el mejor camino.

A mi bella madre, Betsy Serrano, a mis hermanos Ana y David por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento y darme ánimos para seguir adelante, los amo.

Ana nuevamente te agradezco por ese esfuerzo brindado durante toda la evaluación biológica del insecto, por tu sacrificio y porque a pesar del temor a las larvas, me ayudaste y lo hiciste pensando en mí.

A la familia Santamaria Miranda, en especial a mi tía Bleixen, a su esposo Miguel y a mis primos Raúl, Hally y Nathaly por su apoyo incondicional y por siempre confiar en mí.

A mi novia Iciar Montenegro por ser más que mi novia, una amiga y confidente gracias por el apoyo constante.

A mi hijo Magdiel Moreno y a mi sobrina Oriana Mitchell, porque me dieron esa fuerza e impulso para continuar y por alegrarme cada uno de mis días, los amo mis niños.

Con mucho cariño y respeto a mi tío Edwin Samudio (Fulo) y a mí bisabuela María Felipa, por siempre motivarme y porque sé que siempre estuve en sus oraciones para bien.

A mi abuelo Federico Arturo Moreno Q.E.P.D (†) porque me enseñaste desde pequeño el amor por el campo y sobre todo por ser un ejemplo a seguir, te amo abuelo hasta el cielo.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas. Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos Alejandro Aparicio, Axel Sanjur, Joseph Rodríguez y a ti Dixia Concepción, por apoyarme cuando más las necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el aprecio brindado cada día, de verdad mil gracias amigos.

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos han demostrado ser una alternativa promisoriosa para el control biológico de diversas plagas agrícolas a nivel mundial. Sin embargo, en nuestro país hay muy pocos estudios sobre estos microorganismos. Por ello, en este estudio se evaluó la patogenicidad y virulencia de dos aislados de hongos entomopatógenos, sobre larvas de *Galleria mellonella*. Los aislados evaluados fueron *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400) y *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006), ambas pertenecientes a la colección del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Se evaluó la biología de *G. mellonella*, bajo condiciones ambientales locales, Los ensayos se realizaron sobre larvas del quinto instar, las cuales se sumergieron durante 20 segundos en concentraciones de 1×10^7 hasta 1×10^9 conidios ml^{-1} , como control se sumergieron en Tween 80 al 0.1% y se observaron durante 10 días. El ciclo biológico del insecto fue de aproximadamente 62.7 días. Se estableció ocho estadios larvarios tomando como referencia el ancho de la exuvia de la cápsula cefálica, la cual osciló entre 0.18 ± 1.39 mm en el instar I hasta alcanzar un ancho de 2.49 ± 4.10 mm en el instar VIII, con una duración en días de 38.6 ± 1.40 , el quinto instar tiene un tiempo de 3.63 ± 0.76 días. El porcentaje de mortalidad diario, para ambos aislados se calculó utilizando el estimador de supervivencia no paramétrico Kaplan-Meier donde muestra que no existen diferencias significativas ($P=0.23$). La mortalidad para el aislado IDIAP D-Bb1400 fue de 80, 86 y 100% para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidios ml^{-1} respectivamente y para el aislado IDIAP RS-Cj006 osciló entre 90% para la concentración 1×10^7 conidias ml^{-1} y 100% para 1×10^9

conidias ml⁻¹. No obstante, para el aislado IDIAP D-Bb1400 se observó diferencias intraespecíficas entre la concentración 1x10⁹ conidias ml⁻¹ con las otras dos concentraciones. Estos resultados muestran el posible potencial de estos aislados para su futuro uso en la agricultura.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, Control biológico, Hongos entomopatógenos, Seguridad de alimentos.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have proven to be a promising alternative for the biological control of various agricultural pests worldwide. Nevertheless, in our country there are very few studies about these microorganisms. In this study, the pathogenicity and virulence of two native strains of entomopathogenic fungi were evaluated on *Galleria mellonella* larvae. The strains evaluated were *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400) and *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006), both belonging to the collection of the Institute of Agricultural Research in Panamá (IDIAP). The biology of *G. mellonella* was evaluated, under local environmental conditions. The trials were conducted on larvae of the fifth instar, these were submerged for 20 seconds in concentrations of 1×10^7 to 1×10^9 conidia ml^{-1} , as a control they were immersed in Tween 80 at 0.1% and were observed for 10 days. The biological life cycle of the insect was approximately 62.7 days. Eight larval stages were established taking as reference the width of the exuvia of the cephalic capsule, which ranged from 0.18 ± 1.39 mm in instar I until reaching a width of 2.49 ± 4.10 mm in instar VIII, with a duration in days of 38.6 ± 1.40 , the fifth instar has a time of 3.63 ± 0.76 days. The percentage of daily mortality for both strains was calculated using the non-parametric survival estimator Kaplan-Meier where it shows that there are no significant differences ($P = 0.23$). The mortality for the strain IDIAP D-Bb1400 was 80, 86 and 100% for the concentrations 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidia ml^{-1} respectively and for the strain IDIAP RS-Cj006 it ranged between 90% for the concentration 1×10^7 conidia ml^{-1} and 100 % for 1×10^9 conidia ml^{-1} . However, for the IDIAP D-Bb1400 strain, intraspecific differences

were observed between the 1×10^9 conidia ml^{-1} concentration and the other two concentrations. These results show the possible potential of these strains for their future use in agriculture.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, biological control, Entomopathogenic fungi, Food safety.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema:.....	1
1.2. Antecedentes:	3
1.3. Justificación:.....	6
1.4. Objetivos	9
1.4.1. Generales:	9
1.4.2. Específicos:	9
1.5. Hipótesis:.....	9
1.6. Alcances y limitaciones del estudio:	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
2.1. Hongos entomopatógenos utilizados en la investigación.	13
2.1.1. Clasificación taxonómica y descripción de <i>Beauveria bassiana</i>	13
2.1.2. Clasificación taxonómica y descripción de <i>Cordyceps javanica</i> :	16
2.1.3. Clasificación de las principales divisiones de hongos entomopatógenos.	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Lista de materiales	20
3.2. Metodología:.....	21

.....	25
3.2.1. Parámetros a evaluar:.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Biología de <i>Galleria mellonella</i> :.....	30
4.2. Patogenicidad de los aislados <i>Cordyceps javanica</i> (IDIAP RS-Cj006) y <i>Beauveria bassiana</i> (IDIAP D-Bb1400).	33
4.3. DISCUSIÓN	36
5. CONCLUSIONES.....	42
6. RECOMENDACIONES.....	43
7. REFERENCIAS CITADAS.....	44
8. ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. (A) Crecimiento de la colonia en medio SDA. (B) Vista microscópica de la cepa IDIAP D- Bb1400. Foto: Proyecto de Hongos Entomopatógenos IDIAP, 2020.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. (A) Crecimiento de la colonia en medio SDA. (B) Vista microscópica de la cepa IDIAP RS-006. Foto: Proyecto de Hongos Entomopatógenos IDIAP, 2020.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3. Incubación de hongos entomopatógenos.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4. Siembra de hongos entomopatógenos.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5. Ingredientes para la cría de G. mellonella.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. Textura de los ingredientes para la cría de G. mellonella.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Evaluación de la biología de la G. mellonella.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Dimorfismo sexual en pupas de G. Mellonella (A) Macho y (B) Hembra.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9. Diferencia en los palpos labiales entre hembras (A) y machos (B) de G. mellonella.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 10. Procedimiento para realizar un ensayo de patogenicidad. A. Matrices colonizadas por el hongo B. bassiana (Sup) y C. javanica (Inf). B. Lavado con agua destilada y auto clavada. C. Separación de la suspensión conidial, utilizando filtración. D. Diluciones seriadas para realizar los conteos. E. Conteos de conidios utilizando la cámara de Neubauer. F. suspensiones conidiales a diferentes concentraciones. G. inoculación en larvas de G. mellonella. H. Larvas inoculadas y colocadas con dietas para ser evaluadas.....</i>	<i>27</i>

<i>Figura 11. Tasa promedio diaria de oviposición de adultos. de G. mellonella. ...</i>	<i>32</i>
<i>Figura 12. Tasa diaria de larvas emergidas por día de G. mellonella en 10 días.</i>	
<i>.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13. Supervivencia de larvas de G. mellonella tratadas con suspensiones</i>	
<i>fúngicas de $1 \times 10^7, 8, 9$ conidios ml^{-1} de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-</i>	
<i>CJ006.</i>	<i>33</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Elaboración propia a partir de Hibbett et al. (2007), Humber(2012), y (Gryganskyi et al. (2012)	19
Tabla II. Duración en días de los diferentes estados de <i>G. mellonella</i> mantenidos bajo condiciones ambientales locales.	30
Tabla III. Promedio del ancho de las cápsulas cefálicas en milímetros (mm) de los instares de <i>G. mellonella</i> , mantenidos bajo condiciones ambientales locales....	31
Tabla IV. Patogenicidad de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj 006, a concentraciones de 1×10^7 , $8 \cdot 10^8$, $9 \cdot 10^9$ conidias ml^{-1} sobre larvas del v instar de <i>G. mellonella</i>	34
Tabla V. Análisis del tiempo medio de supervivencia para larvas de v instar de <i>G. mellonella</i> , inoculadas con suspensiones fúngicas de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006 a concentraciones de 1×10^7 , $8 \cdot 10^8$, $9 \cdot 10^9$ conidias ml^{-1}	35

ÌNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Determinación de la cantidad de instares de G. mellonella, tomando como referencia la exuvia de la cápsula cefálica.....</i>	<i>58</i>
<i>Anexo 2. Colonización y emergencia de estructuras fúngicas del aislado IDIAP D-Bb1400, sobre larva de G. mellonella.....</i>	<i>58</i>
<i>Anexo 3. Sintomatología (melanización) ocasionada por la infección del aislado IDIAP RS-CJ006.....</i>	<i>59</i>
<i>Anexo 4. Larva colonizada por el aislado IDIAP D-Bb1400.....</i>	<i>59</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema:

En la actualidad la producción de alimentos enfrenta el reto de mantener un alto nivel de calidad, considerando aspectos de inocuidad alimentaria y sistema de producción con retribución más justa para los productores. En el caso de la producción agrícola uno de los principales retos siempre ha sido la lucha contra las plagas de insectos, donde cerca de medio millón de especies se alimentan de plantas o de productos de plantas.

Por ello, desde el origen de la agricultura el hombre siempre ha combatido estas plagas, con énfasis en los insecticidas químicos sobre todo después de la segunda guerra mundial, que en su conjunto han permitido salvar algo más del 70% de la producción agrícola potencial mundial.

Sin embargo, el uso excesivo de insecticidas ha provocado problemas muy graves de contaminación por residuos en los alimentos o de efecto negativo sobre la biodiversidad y el medioambiente, además de inducir en una gran variedad de insectos la resistencia a insecticidas que tiene un mecanismo de acción específico. Por ello, en la actualidad se promueve una agricultura acorde a la creciente población y a la alta demanda de alimentos, pero con métodos que sean amigables al ambiente y que protejan la salud de los consumidores.

Por lo tanto, para este gran reto que tiene la agricultura actual en el mundo se han propuesto algunas tácticas para el control de plagas insectiles que afectan y merman la producción de los diferentes cultivos agrícolas, dentro de estas tácticas

tenemos el control biológico ampliamente utilizado en diversas formas, de las cuales se destaca el uso de hongos entomopatógenos (HE) como una alternativa eficaz y económica, que ayuda a disminuir el uso de insecticidas basados en el uso de químicos sintéticos en las explotaciones agrícolas. En este escenario existe la necesidad de ampliar las investigaciones en la evaluación de diversos aislados de estos hongos, para ver su posible potencial en beneficio de la agricultura, de la salud humana y del medio ambiente.

1.2. Antecedentes:

Los HE son un grupo de organismos filogenéticamente diverso, heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos) que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas (Inglis et al., 2001). Estos organismos tienen la capacidad de infectar y causar enfermedades en artrópodos de los que obtienen la energía necesaria para desarrollarse, como biotrofos y necrotrofos, en un proceso de continua coevolución, causando hasta el 80 % de las enfermedades que padecen las poblaciones de insectos en la mayoría de los ecosistemas terrestres, con énfasis en los ecosistemas agroforestales (Badii y Abreu, 2006; Roy et al., 2006; Vega et al., 2009; Lacey et al., 2015). Los HE se han desarrollado como una importante táctica dentro de la estrategia de manejo integrado de plagas, al presentar mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley y Collins, 2007; Faria y Wraight, 2007; Quesada-Moraga y Santiago-Álvarez, 2008).

Existe un estimado de 700 especies de hongos entomopatógenos en 90 géneros, en el cual la mayoría de los hongos producidos comercialmente son especies de *Beauveria* y *Metarhizium* porque son fáciles de manejar y reproducir en masa (Vega et al., 2009). Los HE para el control de diversas poblaciones de insectos ha sido bastante estudiado (Bukhari y Takken, 2011; Lo Verde et al., 2015; Vega et., 2009), ya que es amigable con el ambiente, no afecta la salud del humano y son persistentes en el ambiente. Además, de que poseen ciertas características muy especiales que le permite sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en

forma saprofita sobre el material vegetal en descomposición, el crecimiento saprofito puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo miceliano. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo (Cañedo y Ames, 2004) y se suelen comercializar en preparados a base de esporas.

La polilla de la cera, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), es considerada uno de los mayores enemigos de las colonias de abejas melíferas en todo el mundo (Hanumanth y Swamy, 2008; Kwadha et al., 2019), y se encuentra distribuida ampliamente excepto en climas muy fríos y en grandes altitudes (Root, 1976). La infestación a gran escala de colonias por larvas de *G. mellonella* generalmente lleva a la pérdida de la colonia, fuga y reducción en el tamaño de los enjambres de abejas migratorias (Williams, 1997; Gulati y Kaushik, 2004). Su importancia económica se debe a los hábitos alimenticios de las larvas y a los túneles que forman en medio de las colmenas (Jackman y Dress, 1998; Chandel et al., 2003). Estas se alimentan de la cera de las colmenas, polen, propóleos, abejas muertas y pupas de abejas (Hanumanthan y Swamy, 2008); sin embargo, su desarrollo y metamorfosis están influenciados por la humedad relativa y la dieta (Abdel-Naby et al., 1983; Mohamed, 1983; Gulati y Kaushik, 2004).

A pesar de la importancia de la polilla mayor de la cera en la industria apícola, también se investiga mucho más como un organismo modelo para estudios en Fisiología de insectos, la Genómica, la Proteómica, entre otros. Las larvas de *G. mellonella*, son utilizadas como hospederos alternativos para la producción de parasitoides y otros enemigos naturales de plagas perjudiciales para los

agroecosistemas (Gallo, 1988), la exigencia cada vez mayor del uso racional y selectivo de pesticidas por parte de los mercados internacionales ha impulsado el desarrollo de un programa de manejo integrado en el que se emplea prácticas agronómicas, etológicas y biológicas en este rubro la crianza de insectos (Rijo, 1996).

1.3. Justificación:

Los hongos sobresalen entre los microorganismos entomopatógenos porque infectan a los insectos a través del integumento, acción por contacto, lo que les permite el control de varios grupos de insectos, siendo los conidios las unidades infectivas más utilizadas. Además, el empleo de estos agentes de control biológico presenta ventajas, como son: seguridad para la salud humana, para la fauna útil, reducción de residuos de insecticidas en los alimentos e incremento de la biodiversidad del medio. Por ello, las investigaciones sobre el empleo HE en el control de plagas de insectos ha experimentado un considerable progreso en las últimas décadas. Un empleo más eficiente y generalizado de estos agentes en el control depende en gran medida de la mejora de su velocidad de acción y virulencia, es decir en la reducción de los tiempos letales a concentraciones menores de conidios (Quesada-Moraga et al., 2009). En este sentido, es necesario seguir aportando estudios sobre la patogenicidad y virulencia de diversos hongos en los diferentes lugares del mundo.

Una variedad de diferentes especies de insectos entre los cuales destaca la polilla de la cera *Galleria mellonella*, han sido utilizado como insecto modelo para estudio de interacciones entre microorganismos y hospederos (Kavanagh y Fallon, 2010; Vilcinskas, 2010). Esto se debe a que es un insecto fácil de criar y los ingredientes que forman parte de su dieta son de bajo costo. Por esto en el presente estudio queremos proveer información de mortalidad y virulencia con aislados nativos de HE, utilizando larvas de *G. mellonella* en el instar V por lo tanto, se realizó la biología con el objetivo de precisar esta etapa. Por otro lado, según nuestro

conocimiento en nuestro país las investigaciones con HE son escasas, por lo que consideramos que nuestro estudio a realizarse en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá y en el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP, CIA Chiriquí), sería de gran importancia para su futura aplicación en la agricultura y biotecnología.

El estudio de la virulencia y patogénesis fúngica, a menudo requiere de un modelo animal apropiado. Los invertebrados, en este caso los insectos se han utilizado recientemente como huéspedes alternativos para evaluar la virulencia de las bacterias y hongos, entre ellos, las larvas de *G. mellonella*; debido a que este insecto tiene un sistema relativamente avanzado de defensas antimicrobianas y por tanto son más propensos a producir información relevante para el proceso de infecciones microbianas. Al igual que los mamíferos, los insectos poseen un sistema inmune innato complejo (Ramarao et al., 2012). Las larvas de la llamada polilla de la cera, *G. mellonella*, se ha demostrado que pueden facilitar gran información útil sobre la virulencia y patogénesis de un amplio espectro de microorganismos, incluyendo hongos entomopatógenos. Además, el sistema inmune de *G. mellonella* muestra una similitud funcional y estructural comparándolo al sistema inmune innato de los mamíferos: los patógenos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patógenos y pueden ser fagocitadas por hemocitos, el equivalente funcional de los neutrófilos en los mamíferos. Al igual que en los neutrófilos, los hemocitos utilizan especies reactivas de oxígeno y enzimas líticas para eliminar los microorganismos patógenos (Bergin et al., 2005). El sistema inmune de *G. mellonella* está

compuesto por seis tipos de células fagocíticas: coagulocitos, granulocitos, plasmacitos, oenocitos, esperulocitos y prohemocitos. El aumento de la densidad de estas células refleja la virulencia de cualquier tipo de interacción patogénica de origen fúngico y también bacteriano (Bergin, 2003; Cotter, 2000).

1.4. Objetivos

1.4.1. Generales:

- Evaluar la mortalidad y virulencia de aislados nativos de hongos entomopatógenos en larvas de *Galleria mellonella*.

1.4.2. Específicos:

- Criar larvas de *Galleria mellonella*.
- Multiplicar aislados de hongos entomopatógenos.
- Realizar ensayos de patogenicidad con dos aislados nativos de HE sobre larvas de *Galleria mellonella*.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de HE sobre larvas de *Galleria mellonella*.

1.5. Hipótesis:

- **Hipótesis (a):** Los aislados de HE son patogénicas sobre larvas de *Galleria mellonella*.
- **Hipótesis (0):** Las aislados de HE no causan efectos patogénicos sobre larvas de *Galleria mellonella*

1.6. Alcances y limitaciones del estudio:

Este ensayo nos permitirá evaluar y determinar aislados nativos de hongos entomopatógenos y su futura y posible aplicación en la agricultura y biotecnología, con la finalidad también futura de reducir el uso de insecticidas químicas y de esta manera aportar a la seguridad, inocuidad y soberanía alimentaria de nuestra población. Además, el mantenimiento y conservación de aislados de HE es una actividad muy importante por lo que es absolutamente esencial disponer de forma permanente de estos recursos, para el desarrollo de diferentes líneas de investigación, sobre todo en su patogenicidad, carácter endófito, actividad biológica, citotóxica e insecticida de sus proteínas y metabolitos secundarios. Dentro de las limitaciones que se dieron, se encuentra los aislamientos e identificación a nivel macro y microscópicos de los hongos encontrados en las giras de campo debido a la situación de covid-19, dado que se mantuvo cerrada nuestro centro de estudios y no se logró cumplir con esta parte. Sin embargo., por medio del convenio Universidad de Panamá - Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), solicitamos aislados de HE al laboratorio de Entomología de (David, Coquito, CIA Chiriquí) pertenecientes a la primera colección de HE con utilidad en la agricultura. Por lo que se nos permitió emplear las aislados endémicos IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-CJ006 de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps javanica* respectivamente.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los segundos se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio. Según Agrios, (2005); los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen.

Dentro de todos los tipos de hongos existentes se destacan las especies de HE que dentro del control biológico son una de las más distribuidas y de mayor relevancia en la protección de los cultivos. Pertenecen a los ascomicetos mitospóricos entomopatógenos, clasificados en el orden Hypocreales del Filo Ascomycota. La mayoría de los ascomicetos mitóspóricos tienen ciclos vitales que sincronizan con los de sus hospedantes, así como con las condiciones ambientales del entorno (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008). Su modo de acción, es por contacto, por vía tegumentaria y los hace singulares dentro de los agentes de control microbiano de plagas (Quesada–Moraga y Santiago–Álvarez, 2008; Jaronski, 2010; Quesada–Moraga et al., 2014).

El ciclo de vida de los ascomicetos mitospóricos comprende dos fases, una patogénica y la otra saprofitica. La fase patogénica involucra cuatro pasos

principales: adhesión, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi et al., 2003). La colonización se inicia con la adhesión de los conidios del hongo a la cutícula del insecto hospedante, donde se adhieren fuertemente debido a mecanismos mediados por fuerzas hidrofóbicas de su pared celular (Ortiz–Urquiza y Keyhani, 2013), a lo que sigue la formación de un tubo germinativo y en ocasiones de estructuras de anclaje tipo apresorio, a lo que sigue la penetración de la cutícula gracias a una combinación de acciones mecánicas y bioquímicas que facilitan la invasión del hemocele donde el hongo crece en forma de cuerpos hifales, una vez que vence la respuesta defensiva del hospedante, tanto celular (fagocitosis y encapsulación), como humoral (producción de fenoloxidasa, lectinas u otras proteínas y péptidos defensivos).

La muerte del hospedante ocurre por la invasión de tejidos y órganos, por la utilización de parte de sus nutrientes, y/o por el efecto de los metabolitos tóxicos producidos por el mismo (Ríos–Moreno et al., 2016). La muerte del insecto marca el fin de la fase patogénica, y da lugar a la saprofítica pues en condiciones favorables, las hifas emergen del cadáver, donde producen conidióforos y conidios, que se dispersarán a través del viento, la lluvia o los propios insectos, y se iniciará un nuevo ciclo de infección.

2.1. Hongos entomopatógenos utilizados en la investigación.

2.1.1. Clasificación taxonómica y descripción de *Beauveria bassiana*.

Reino: Mycota

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

Epíteto: *bassiana*

Es un hongo ascomiceto mitospórico que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes Epítetos, causando la enfermedad blanca de la muscardina, Nombre por el cual se la conoce. Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de las plantas (Aquino, 2005).

Se le ha encontrado atacando unas 700 especies de insectos y ha sido utilizado para controlar varios tipos de plagas, incluyendo holometábolos como coleópteros (Tafoya et al., 2004; Güerri-Agulló et al., 2011) y lepidópteros (Knutson y Gilstrap, 1990; Lozano-Gutiérrez y España-Luna 2008; Wraight et al., 2001); así como hemimetábolos, como los chinches (Reinert et al., 1999), thrips (Castineiras et al., 1996; Ludwig y Oetting, 2002) y áfidos (Akbari et al., 2014; Castillo-López et al., 2014). Se ha utilizado contra plagas de gran importancia económica como la mosca blanca de hoja plateada (*Bemisia argentifolii*) (Wraight et al., 2000) y la

broca del café (Bustillo, 2003; Góngora-Botero et al., 2009). Incluso se ha utilizado en otros artrópodos difíciles de controlar como las garrapatas (Kirkland et al., 2004).

Descripción morfológica de la colonia: Es un hongo deuteromiceto que crece formando una estructura algodonosa y polvosa de color blanco conocida como muscardina blanca. Cuando la colonia va envejeciendo se vuelve crema amarillenta (Figura 1).

El revés es de color rojizo en el centro cuando está en crecimiento y amarillo alrededor (Garces, 2014).

Descripción microscópica: Morfológicamente, *Beauveria bassiana* está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 μm de diámetro, de donde se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis (Barron, 2001; Carrillo, 2005; Kouassi, 2001). Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas (Kouassi, 2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blancuzca para el ojo humano (Barron, 2001).



Figura 1. (A) Crecimiento de la colonia en medio SDA. (B) Vista microscópica de la cepa IDIAP D- Bb1400. Foto: Proyecto de Hongos Entomopatógenos IDIAP, 2020.

2.1.2. Clasificación taxonómica y descripción de *Cordyceps javanica*:

Reino: Mycota

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Cordyceps*

Epíteto: *javanica*

Este género causa la llamada muscardina amarilla en insectos y también presenta especies que pueden atacar nematodos de plantas (Alves, 1998). La especie más importante del género es *Paecilomyces fumosoroseus* reclasificada actualmente como (*Isaria fumosorosea* Wize), utilizada para el control de plagas que afectan cultivos de gran importancia económica, al igual que *Isaria javanica* (Friedrichs y Bally) Samson y Hywel-Jones; reclasificada como (*Paecilomyces javanicus*) (Yang et al., 2006) y que actualmente es considerada y clasificada según la página especializada Index Fungorum como *Cordyceps javanica*. Entre las plagas que infecta se encuentra *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Lyriomisa trifolli*, las termitas, Thrips, *Musca doméstica*, *Spodoptera littoralis* (Carr et al., 2003), *Spodoptera frugiperda* (Lezama-Gutiérrez et al., 1994).

Descripción morfológica de la colonia: Las colonias crecen de 5-7 cm en 14 días a 25°C presentando una coloración rosa, roja o purpura, dependiendo de la especie y el medio. La colonia inicialmente es blanca, luego adquiere un tinte rosado muy tenue (pálido). El revés de la colonia es al comienzo ligeramente amarillento, pero a medida que pasa el tiempo se vuelve de color anaranjado intenso (Cañedo y Ames, 2004). El crecimiento óptimo para el desarrollo del microorganismo ocurre en un rango de 26- 30°C, con un pH de 2-10 (Domsch y Gams, 1980).

Descripción microscópica: Presenta hifas hialinas a amarillas, séptadas y con paredes lisas y delgadas. La estructura conidiógena es un sinema o nomosinema que consiste en hifas compactadas, conidióforos verticilados e irregulares con ramificaciones terminales, en donde surgen racimos ensanchados en forma de botella, con un cuello distintivo donde nacen las conidias las cuales crecen en cadena en forma basipétala por una célula, raramente dos, hialina o ligeramente pigmentada con paredes lisas o equinuladas o hasta varias formas (Berlanga, 1997).

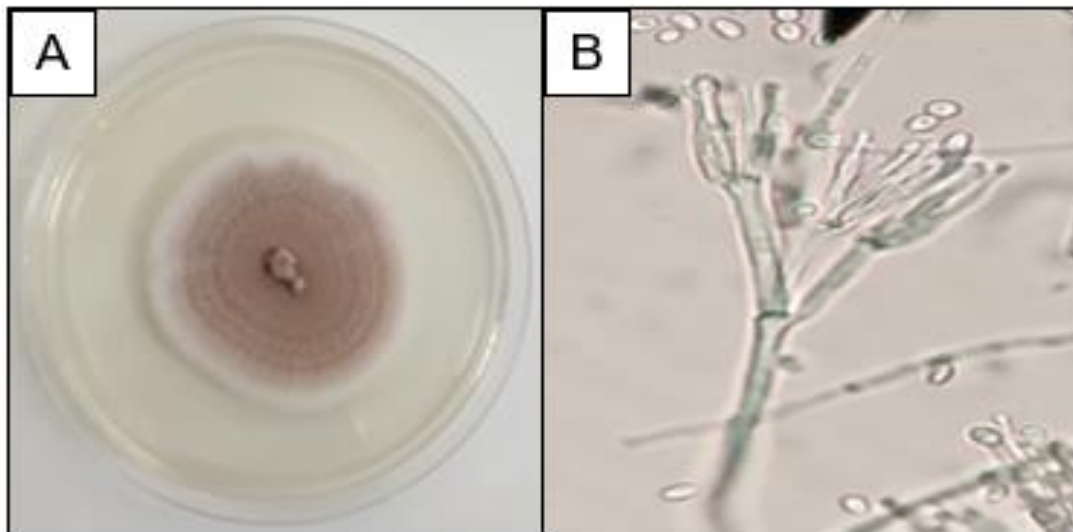


Figura 2. (A) Crecimiento de la colonia en medio SDA. (B) Vista microscópica de la cepa IDIAP RS-006. Foto: Proyecto de Hongos Entomopatógenos IDIAP, 2020.

2.1.3. Clasificación de las principales divisiones de hongos entomopatógenos.

Tabla I. Elaboración propia a partir de Hibbett et al. (2007), Humber(2012), y (Gryganskyi et al. (2012)

División	Clase	Orden	Familia	Género
Entomophthoromycota	Entomophthoromycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Batkoa, Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Eryniopsis, Furia, Massospora, Orthomyces, Pandora, Strongwellsea, Zoophthora.</i>
			Ancylistaceae	<i>Ancylistes, Conidiobulus, Macrobiotophthora.</i>
			Completoriaceae	<i>Complectoria.</i>
	Basidiobolomycetes	Basidiobolus	Meristacraceae	<i>Mersitacrum, Tabanomyces.</i>
			Basidiobolaceae	<i>Basidiobolus.</i>
			Neozygitaceae	<i>Apterivorax, Neozygites, Thaxterosporium.</i>
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Archersonia, Hypocrella, Metacordyceps, Metarhizium, Normurea, Pochonia, Regiocrella, Tipo-Paecilomyces, Tipo-Verticillium.</i>
			Cordycipitaceae	<i>Beauveria, Cordyceps, Engyodontium, Isaria, Lecanicillium, Simplicillium, Microhilum, TipoMarianaea, Torribiella.</i>
	Eurotiomycetes	Eurotiales	Ophicordycipitaceae	<i>Culicinomyces, Elaphocordyceps, Hirsutella, Hymenostibe, Metharhiziopsis, Ophiocordiceps, Paraisaria, Sorosporella.</i>
			Trichocomaceae	<i>Paecilomyces.</i>

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lista de materiales

Biología de *G. mellonella*:

Algodón, bolígrafos, cajas plásticas, envases de vidrio, estereoscopio, goteros, harina de trigo, juego de disección, leche de ternero, miel de abeja, papel adherente, papel encerado, papel toalla, platos de petri, salvado de trigo, termohigrómetro y vidrio reloj.

Prueba de patogenicidad:

Agua destilada, autoclave, balanza digital, cámara fotográfica, cámara de Neubauer, cinta adhesiva, colador, cubreobjetos, goteros, incubadoras, marcadores, matraces, medios de cultivo Papa dextrosa agar (PDA) y Sabouraud dextrosa agar (SDA), micropipetas, microscopio, parafilm, papel toalla, platos petri, puntas de micropipeta, portaobjetos, refrigeradora, tabla de registro, Tween 80, tubos de ensayo, tubos falcón, vaso químico y viales de vidrio.

3.2. Metodología:

Los HE se cultivaron en medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), con antibiótico (Cloranfenicol 0.5 g/L) dentro de una cámara estéril de flujo laminar para evitar contaminación (Figura 3). La incubación se realizó a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 4).



Figura 4. Siembra de hongos entomopatógenos



Figura 3. Incubación de hongos entomopatógenos.

La cría y evaluación biológica de *G. mellonella*, se estableció obteniendo larvas de panales infectados con la polilla, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá sede (Chiriquí) ($8^{\circ}23'41.79''\text{N} - 82^{\circ}19'47.60''\text{O}$) y llevados al laboratorio del Instituto de Investigación Agropecuaria (IDIAP) David, provincia de Chiriquí al occidente de la República de Panamá. La instalación del pie de cría se

estableció en una dieta artificial que consistió en una mezcla de 400 g de salvado de trigo, 120 g de harina de trigo, 160 g de leche de ternero y 300 ml de miel por cada 680 g de dieta (Figura 5 y 6). Los valores ambientales registrados en °C y humedad relativa (HR) fueron un mínimo de 25°C con HR de 58%, un máximo de 33°C y 86% respectivamente; obteniendo un promedio de 28°C y 76% de HR.



Figura 5. Ingredientes para la cría de *G. mellonella*.



Figura 6. Textura de los ingredientes para la cría de *G. mellonella*.

Los parámetros biológicos evaluados fueron:

Huevo: Para determinar la duración del estado de huevo de *G. mellonella*, se tomaron submuestras de posturas diarias de 15 hembras que fluctuaron de 2 a 40, para totalizar 1503 individuos.

Larva: Se tomaron larvas recién emergidas y se colocaron en un plato petri con 0.1 g de dieta artificial y éste se tapó con papel adherente para garantizar que la larva no escapara del plato de petri (Figura 7). El experimento se inició con una unidad experimental de 40 larvas y diariamente se observó el cambio de instar a través de la exuvia de la cápsula cefálica, la cual se midió utilizando el software (Leica Application Suite) incorporado a un estereoscopio (Leica MZ 125).

Pupa: Una vez la larva de último instar pasó al estado de pupa, se registró la duración de este estadio, su mortalidad y el sexo a partir de la observación de la genitalia en el estereoscopio (Figura 8).

Adulto: Se sexaron (Figura 9) y confinaron 15 hembras recién emergidas de la pupa con su respectivo macho en pequeños frascos de vidrio, con una pequeña porción de algodón que contenía una solución de miel de abeja al (10%) y por último se colocó papel encerado en forma de acordeón para que la hembra ovipositará y se evaluó la tasa de oviposición diaria y mortalidad del adulto.

Los datos obtenidos en la biología se sometieron a un diseño experimental completamente aleatorizado (ANOVA) análisis de varianza.

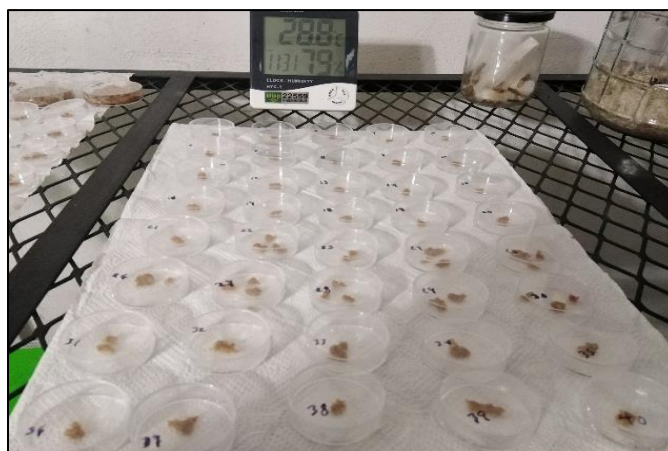


Figura 7. Evaluación de la biología de la *G. mellonella*.

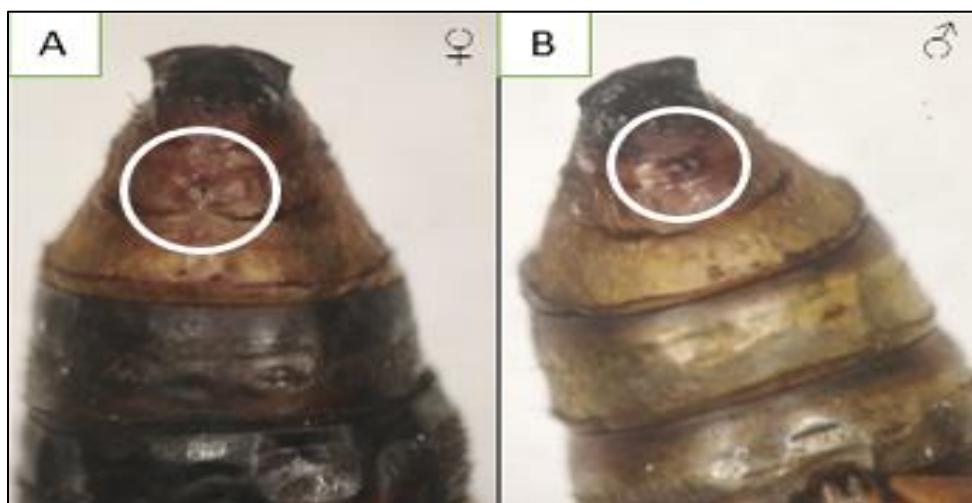


Figura 8. Dimorfismo sexual en pupas de *G. mellonella* (A) Macho y (B) Hembra.

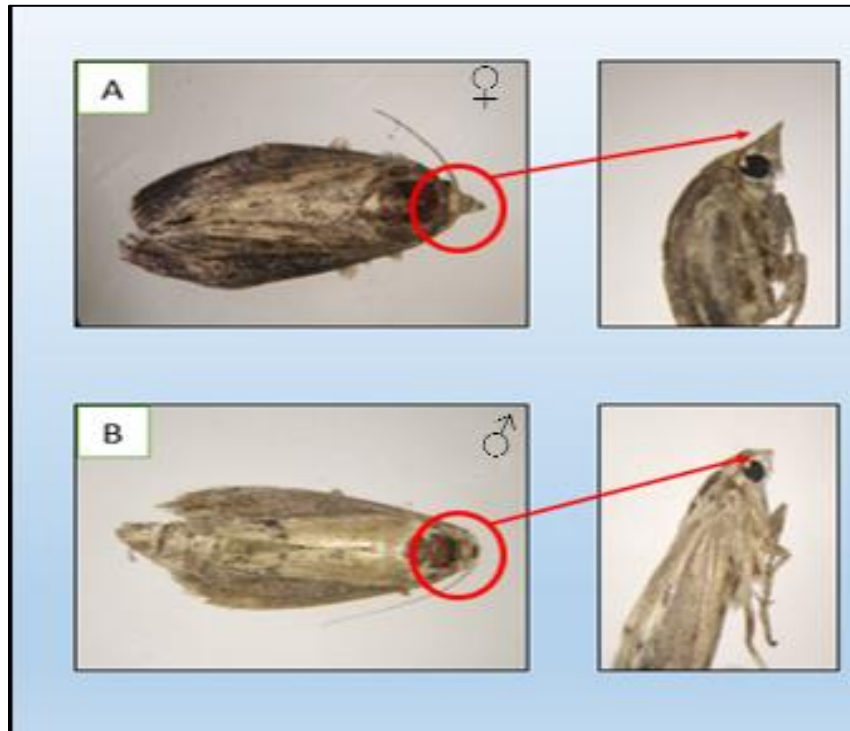


Figura 9. Diferencia en los palpos labiales entre hembras (A) y machos (B) de *G. mellonella*.

Tratamiento de las larvas: (Figura 10) se preparó una suspensión de conidios obtenida a través de una matriz de arroz colonizada por el hongo entomopatógeno, en una solución acuosa estéril de Tween 80 al 0,1%. Estas suspensiones iniciales se sonicaron durante 5 minutos para homogeneizar la suspensión conidial y luego se filtraron a través de varias capas de estopilla para eliminar las estructuras miceliales. Las suspensiones de conidios utilizadas para los bioensayos se ajustaron diluyendo los conidios con Tween 80 al 0,1% hasta una concentración final de $1 \times 10^{7,8,9}$ conidios ml^{-1} . El número de conidios se estimó utilizando la cámara de Neubauer, realizando diluciones seriadas a partir de la solución madre y aplicando la fórmula de (Leucona, 1995) para calcular los volúmenes a extraerse de la solución inicial, en donde se encuentra el hongo en altas concentraciones.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

C_i = concentración inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

$$\frac{X_i V_f}{C_i} = C_f$$

Leucona, 1995

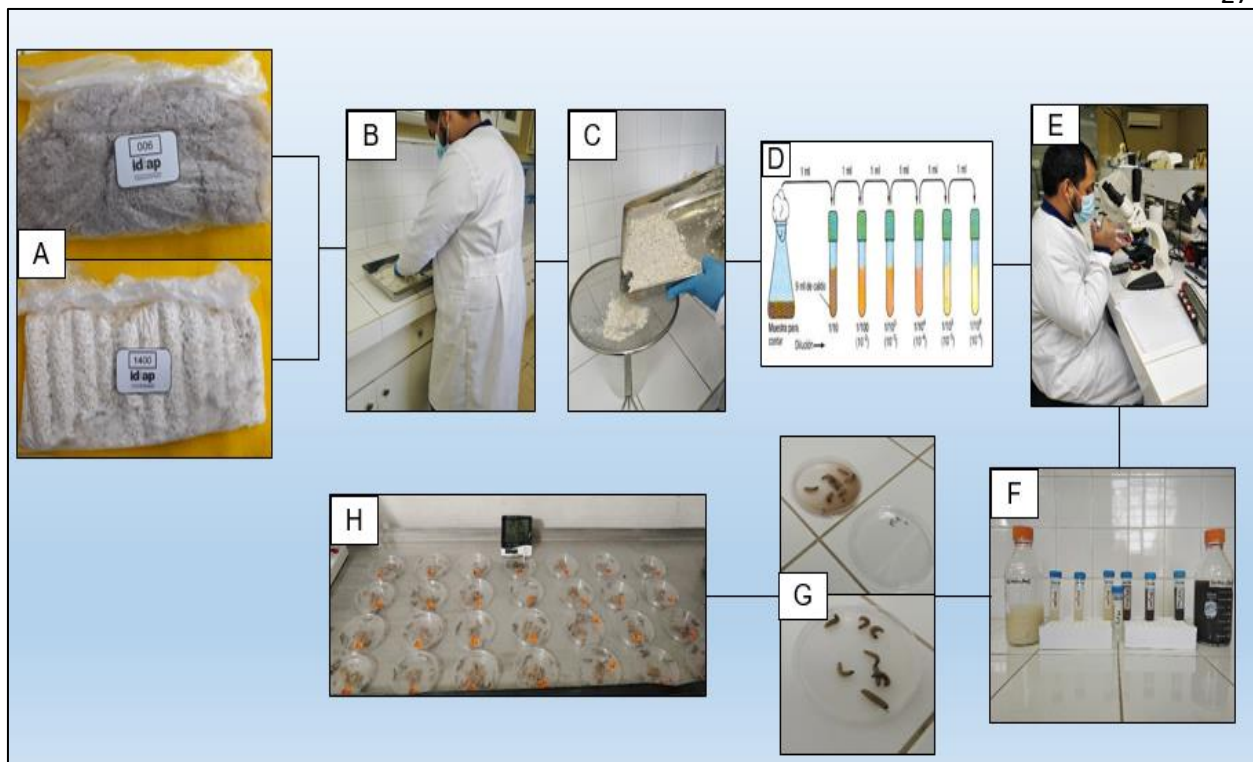


Figura 10. Procedimiento para realizar un ensayo de patogenicidad. A. Matrices colonizadas por el hongo *B. bassiana* (Sup) y *C. javanica* (Inf). B. Lavado con agua destilada y auto clavada. C. Separación de la suspensión conidial, utilizando filtración. D. Diluciones seriadas para realizar los conteos. E. Conteos de conidios utilizando la cámara de Neubauer. F. suspensiones conidiales a diferentes concentraciones. G. inoculación en larvas de *G. mellonella*. H. Larvas inoculadas y colocadas con dietas para ser evaluadas.

Patogenicidad y virulencia:

La virulencia fúngica por cepa se evaluó en diez larvas de quinto estadio de *G. mellonella*, estas fueron sumergidas en suspensiones de $1 \times 10^{7, 8, 9}$ conidios ml^{-1} durante 20 segundos y luego se colocaron en placas de petri con dieta a temperatura ambiental. La mortalidad larvaria se registró diariamente durante 10 días, con lo cual evaluamos los parámetros de patogenicidad (capacidad de producir enfermedad), virulencia (grado en que se causa enfermedad) y se evaluó la supervivencia. Las larvas muertas se esterilizaron inmediatamente con hipoclorito de sodio al 1%, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron en platos petri con papel filtro humedecido con agua estéril a temperatura ambiente, con el fin de observar si hubiese crecimiento fúngico. Las larvas utilizadas como control se sumergieron en agua estéril con Tween 80 al 0,1% y se evaluaron de igual forma, se realizaron tres repeticiones. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado sometido a un análisis de varianza (ANOVA) ($P = 0,05$) y análisis de comparación de rango Mann-Whitney. La concentración letal media (CL50) y el tiempo medio de supervivencia, se determinaron a través del programa informático de análisis Probit y empleando el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier respectivamente.

3.2.1. **Parámetros a evaluar:**

La duración en días del ciclo biológico de la polilla mayor de la cera *G. mellonella* bajo condiciones ambientales locales de temperatura y humedad relativa, evaluando la duración de los diferentes instares (huevo, larva, pupa y adulto), tasa de oviposición y mortalidad por estadio. Enfocándonos en la etapa larval para precisar el instar V.

Evaluar el potencial patogénico y virulento de dos aislados nativos de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* IDIAP D-Bb1400 y *Cordyceps javanica* IDIAP RS-Cj006 sobre larvas de *G. mellonella* de V instar a diferentes concentraciones 1×10^7 , $8 \cdot 10^7$, $9 \cdot 10^7$ conidios ml^{-1} para determinar el tiempo medio de supervivencia (TMS) y la concentración letal media (CL50).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4. RESULTADOS

4.1. Biología de *Galleria mellonella*:

Fue determinado el ciclo biológico de *G. mellonella*, el cual presenta metamorfosis completa y cuenta con las siguientes etapas: huevo, 8 estadios larvarios, pupa y adulto. La duración para cada una de estas fases es 7.1, 38.6, 9.22 y 6.7 días respectivamente, tal como se observa en la tabla II, podemos apreciar que los instares larvales difieren en la duración de los días, donde los de menor duración fueron el instar II y III con un promedio de 2.83 días y el de mayor duración fue el instar 8 con un promedio de 11.37 días. Cabe destacar que los instares I y IV registraron mayor mortalidad.

Tabla II. Duración en días de los diferentes estados de *G. mellonella* mantenidos bajo condiciones ambientales locales.

Ciclo biológico completo					Hembras				Machos			
Estado	N	X Días	Min Días	Max Días	N	X DÍAS	Min Días	Max Días	N	X Días	Min Días	Max Días
Huevo	1501	7.16±1.42	4	10	—				—			
Larva I	29	5.72±1.39	4	10	—	5.73±1.74	4	10	—	6.13±1.97	4	9
Larva II	24	2.83±0.64	2	4	—	2.91±0.54	2	4	—	3.13±0.64	2	4
Larva III	24	2.83±1.05	2	6	—	2.91±1.30	2	6	—	3.13±0.83	2	4
Larva IV	19	3.47±1.12	2	7	—	3.36±0.67	3	5	—	3.63±1.60	2	7
Larva V	19	3.63±0.76	3	6	—	3.64±0.92	3	6	—	3.63±0.52	3	4
Larva VI	19	3.47±0.84	2	5	—	3.45±0.82	2	5	—	3.50±0.93	2	5
Larva VII	19	5.31±1.37	3	7	—	5.55±1.44	3	7	—	5.00±1.31	7	5
Larva VIII	19	11.37±4.10	6	18	—	11.45±4.25	7	18	—	11.38±4.27	6	17
Pupa	18	9.22±1.40	6	12	10	9.10±1.37	7	12	8	8.63±1.77	6	12
Adulto	18	6.72±1.84	5	11	10	6.80±2.98	4	10	8	6.63±1.85	4	10

Tabla III. Promedio del ancho de las cápsulas cefálicas en milímetros (mm) de los instares de *G. mellonella*, mantenidos bajo condiciones ambientales locales.

ÍNSTAR	N	X (mm)	Min	Max
I	29	0.18±0.02	0.16	0.23
II	24	0.25±0.04	0.21	0.35
III	24	0.35±0.06	0.25	0.48
IV	19	0.49±0.08	0.35	0.69
V	19	0.7±0.14	0.47	1.08
VI	19	1.06±0.21	0.75	1.44
VII	19	1.53±0.16	1.09	1.69
VIII	19	2.49±0.38	1.57	2.94

Durante la evaluación del ciclo biológico, se estableció ocho estadios larvarios tomando como referencia el ancho de la exuvia de la cápsula cefálica, la cual osciló entre 0.18 mm en el instar I hasta alcanzar un ancho de 2.49 mm en el VIII instar (Tabla III).

Se evaluó la tasa promedio diaria de oviposición para 15 hembras, donde el tercer día hubo mayor tasa de oviposición y posteriormente fue decreciendo hasta el día 8 donde se registra la muerte y la tasa de oviposición más baja con 1.8 huevos (Figura 11). Además, se estimó la tasa diaria de larvas emergidas, colocando 1716 huevos y siendo evaluados por 10 días, donde se observa que el día 4 fue el que presento menor cantidad de larvas emergidas con 2 solamente y el de mayor eclosión fue el día 7 con 410 larvas, obteniendo un total de larvas emergidas de 1503 en 10 días; tal como se señala en la (Figura 12).

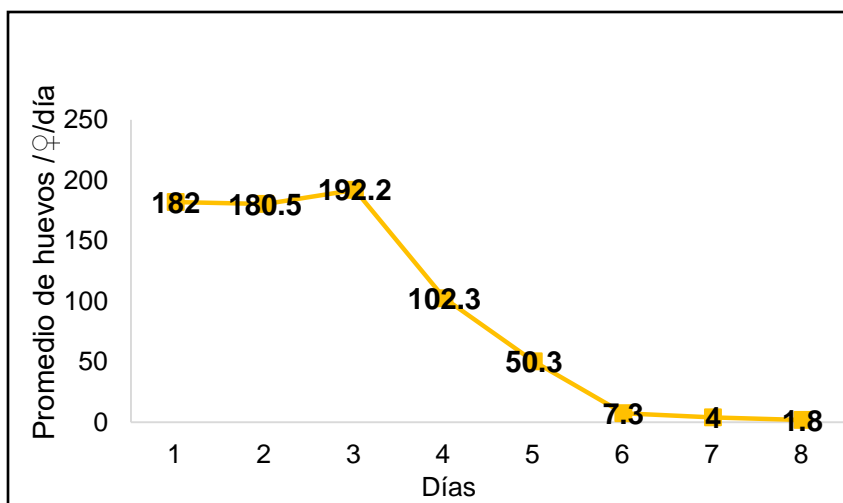


Figura 11. Tasa promedio diaria de oviposición de adultos. de *G. mellonella*.

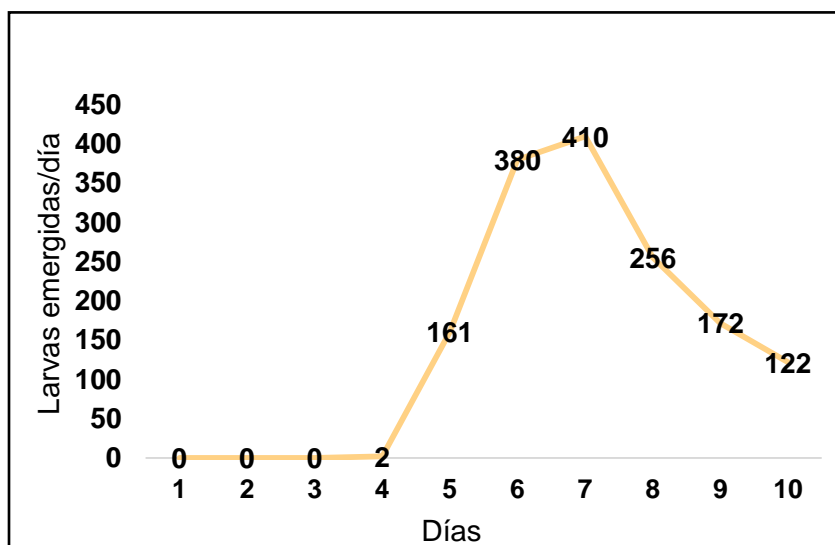


Figura 12. Tasa diaria de larvas emergidas por día de *G. mellonella* en 10 días.

4.2. Patogenicidad de los aislados *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006) y *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400).

El porcentaje de mortalidad diario, para ambos aislados se calculó utilizando el estimador de supervivencia no paramétrico Kaplan-Meier donde muestra que no existen diferencias significativas ($P=0.23$) para las concentraciones 1×10^7 , $8 \cdot 10^7$, $9 \cdot 10^7$ conidios ml^{-1} . Sin embargo, se muestra que el día que se empieza a registrar mortalidad para IDIAP RS-Cj006 y IDIAP D-Bb1400 fueron los días 3 y 4 respectivamente, tal como lo señala la (Figura 13).

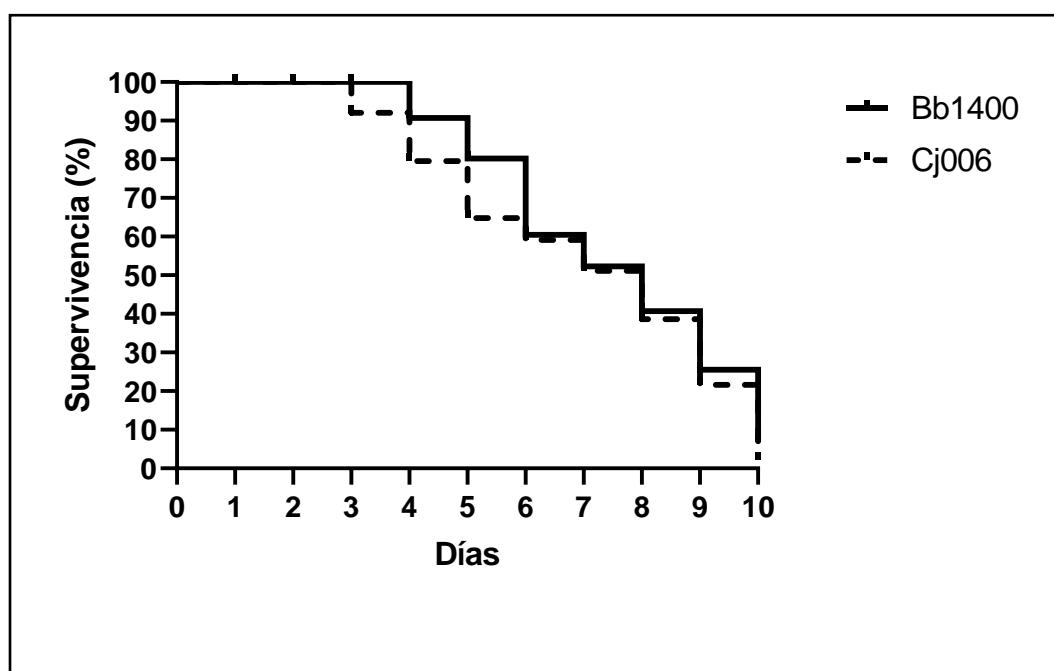


Figura 13. Supervivencia de larvas de *G. mellonella* tratadas con suspensiones fúngicas de 1×10^7 , $8 \cdot 10^7$, $9 \cdot 10^7$ conidios ml^{-1} de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-CJ006.

Tabla IV. Patogenicidad de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj 006, a concentraciones de 1×10^7 , 10^8 , 10^9 conidias ml^{-1} sobre larvas del v instar de *G. mellonella*.

CEPAS	Mortalidad (Promedio \pm SE) %* En suspensiones de conidios/ ml^{-1}		
	1×10^7	1×10^8	1×10^9
D-Bb1400	80.00 \pm 0.00 a*m	86.67 \pm 3.33 a*m	100.00 \pm 0.00 a*n
RS-Cj006	90.00 \pm 0.00 a*m	96.67 \pm 3.33 a*m	100.00 \pm 0.00 a*m

* Las mismas letras dentro de las columnas indican que no hubo diferencias significativas y diferentes letras dentro de las filas indican que existen diferencias significativas intraespecíficas para la cepa.

La patogenicidad de Los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006, se analizaron estadísticamente utilizando el test de Mann-Whitney el cual indica que no hubo diferencias significativas ($P=0.41$) entre ambos aislados y concentraciones evaluadas, la mortalidad para la cepa D-Bb1400 fue de 80, 86 y 100% para concentraciones 1×10^7 , 10^8 , 10^9 respectivamente, y para la cepa IDIAP RS-Cj006 osciló entre 90% para la concentración 1×10^7 conidias ml^{-1} y 100% para 1×10^9 conidias ml^{-1} . No obstante, para el aislado IDIAP D-Bb1400 se observó diferencia entre la concentración 1×10^9 conidias ml^{-1} con las otras dos concentraciones (Tabla IV).

Una vez obtenidos los datos de mortalidad para IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj 006, se calculó el tiempo medio de supervivencia (TMS) empleando el estimador no paramétrico Kaplan-Meier donde no se observó ($P=0.41$) diferencias significativas entre ambos aislados y la CL50 se calculó con el programa

informático de Probit dando como resultado 1.8×10^6 para la cepa IDIAP RS-Cj006 y 5.8×10^6 conidias ml^{-1} para la cepa IDIAP D-Bb1400 (Tabla V).

Tabla V. Análisis del tiempo medio de supervivencia para larvas de v instar de *G. mellonella*, inoculadas con suspensiones fúngicas de los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006 a concentraciones de $1 \times 10^{7, 8, 9}$ conidias ml^{-1} .

Análisis de Tiempo medio de supervivencia y CL50			
AISLADOS	TMS (días, \pm promedio SE)	CL50	95% CI
IDIAP D-Bb1400	$7.31 \pm 0.22^*a$	$5.8 \times 10^6^*a$	6.86-7.76
IDIAP RS-Cj006	$7.00 \pm 0.25^*a$	$1.8 \times 10^6^*a$	6.48-7.51

* Las mismas letras dentro de las columnas indican que no hubo diferencias significativas en el TMS y en la CL50 en conidias ml^{-1} .

4.3. DISCUSIÓN

La virulencia y mortalidad de dos aislados nativos fueron evaluadas utilizando larvas del V instar del insecto modelo de estudio *G. mellonella*, proveyendo interesantes resultados reportados según nuestro conocimiento por primera vez en Panamá. Donde primeramente de estudio el ciclo de vida del insecto en estudio.

En cuanto a la biología de *G. mellonella*, en la etapa de huevo, el período de incubación fue de 7.16 días promedio obteniendo en este tiempo el mayor porcentaje de eclosión de larvas. A pesar de que en nuestra investigación se llevó a cabo bajo temperaturas ambientales no controladas, estos registros coinciden con los reportados por (Williams, 1990), quien menciona que el tiempo de eclosión para *G. mellonella* va de 5 a 8 días con una temperatura de 24 a 28°C.

Se registraron ocho estadios larvarios (L), donde el estadio de mayor duración fue el instar ocho con un promedio de 11.37 días y el de menor duración fueron los instares LII y LIII con un promedio de 2.83 días. Estos datos difieren a los obtenidos por (Zenner y Posada, 1992) y (Lyon, 2007), que reportaron siete instares larvarios para este insecto a temperaturas inferiores a 25°C. Sin embargo, son semejantes a los obtenidos por (Realpe-Aranda et al., 2007) quienes reportaron que las larvas de *G. mellonella* a temperaturas constantes de 25 y 30°C pasaron por ocho instares, es importante señalar, que la duración en días para cada estadio fue diferente y que probablemente esto se deba a lo señalado por Cardoso (2007), quien indica que la duración de los estadios larvales guarda una relación inversa con la temperatura y la humedad relativa, de modo que a medida

que estas aumentan la duración del estadio es menor. Debido a que las condiciones en que se realizó el ensayo fueron condiciones ambientales no controladas con promedios de 28°C y 76% de HR (25°C-33°C; 58%-86%) y posiblemente se deba a esto que algunos instares, obtuvieran una mayor duración.

El análisis de Kaplan-Meier indica que existe diferencia significativa ($P=0.001$) en la supervivencia de los diferentes instares de *G.mellonella* (Larva, pupa y adulto), pero donde se observó un mayor porcentaje de mortalidad fue en LI, LII y LIV con (27.5, 17.2 y 20.8%) respectivamente; esto posiblemente se debe a que son larvas de tamaño muy pequeño y son sensibles a variaciones ambientales de temperatura y humedad relativa, por lo que pueden presentar una mayor probabilidad de ser afectadas por daños mecánicos a la hora de evaluarse.

Para el estado de pupa la duración fue de 9.22 días en promedio, datos muy similares a los obtenidos por (Neira y Manquian, 2004) que mencionan que para esta fase la duración es de 9 días, en un rango de temperatura que va desde los 25-33°C (con 0.22 días más obtenidos en este trabajo de tesis). En la fase adulta se registró un promedio de vida de 6.72 días, en cual la hembra obtuvo un promedio de 6.80 y el macho 6.6 días. Por lo que son muy semejantes a los encontrados por (Williams, 1990) quien menciona que el estado adulto de *G. mellonella* puede sobrevivir 1 a 3 semanas (7 a 21 días) en un rango de temperaturas que van desde 28 a 35°C.

En estas condiciones la duración total del ciclo biológico fue de 62.7 días y se registró una mortalidad de (12.4, 52.5 y 5.3%) para huevo, larva y pupa

respectivamente; resultados muy parecidos a los obtenidos por (Realpe-Aranda et al., 2007); en el que registraron 62.4 días a una temperatura constante de 30°C y a los mencionados por (Neira, 2006) la cual indica que de acuerdo a las condiciones de temperatura, el ciclo puede ser de 30 a 62 días con temperaturas óptimas que van desde los 26° a 38° C, o de 5 meses con temperaturas más bajas. No obstante, el tiempo que dura el ciclo de desarrollo del insecto puede deberse a los factores físicos y biológicos del medio (Kopacek et al., 1995).

En nuestro estudio se obtuvo un TMS de 7.31 y 7.00 días, una CL50 de 5.8×10^6 y 1.8×10^6 conidios ml⁻¹ para los aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006 respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ambos aislados (P=0.41). Sin embargo, es notable que IDIAP D-Bb1400 mostró un porcentaje inferior de mortalidad para cada concentración presentando diferencias intraespecíficas en la concentración 1×10^9 conidios ml⁻¹ en donde alcanzó un 100% de mortalidad, en comparación a las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidios ml⁻¹ que lograron 80.0 y 86.6%, respectivamente de mortalidad en los días evaluados y por consiguiente su CL50 es un poco elevado en comparación a al aislado RS-006, aunque no mostró estadísticamente diferencias significativas dentro de la misma cepa, cabe destacar que se logró una mortalidad de 90.0, 96.6 y 100%, para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios ml⁻¹. No obstante, a pesar de no presentar diferencias significativas, esta cepa mostró un porcentaje levemente más alto de mortalidad que el aislado IDIAP D-Bb1400).

Estos resultados son interesantes si se comparan con experimentos similares en donde, *C. javanica* ha mostrado un gran potencial como agente de biocontrol para

varias plagas de insectos, dando como resultados TMS similares a los nuestros para larvas de lepidópteros y variando de acuerdo al orden de insecto, resulta importante mencionar que esta cepa (IDIAP RS-Cj006) recientemente se caracterizó molecularmente y fue encontrada y aislada a partir de (*Trialeurodes vaporariorum*) mosca blanca (González-Dufau, 2015) con accesión al (GenBank: KM234218.1), lectotipo de la especie. En otras investigaciones se informa que *C. javanica*, cepa URM4993 causó 100% mortalidad de la termita asiática *Coptotermes gestroi* (Wasmann, 1896) después de seis días con una CL50 de 4.86×10^5 conidios ml^{-1} y TMS es de 2,26 días (Lopes et al., 2011). Asimismo, causó una mortalidad del 88,1% del pulgón verde del melocotón *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) con TMS de cuatro días; 85% de mortalidad en cinco días frente a trips amarillo del sur *Thrips palmi* Karny; y 79,62% de mortalidad en ocho días contra la polilla del té *Andraca theae* (Matsumura, 1909) (Hu, 2014). Otro estudio demostró que *C. javanica* fue patógeno para dos especies de áfidos, *Hyalopterus pruni* (Geoffroy, 1762) y *Aphis pomi* de Geer, causando 66,67 y 75,59% de mortalidad, respectivamente, después de seis días inoculación con una suspensión que contenía 1×10^8 conidios ml^{-1} (Hasan et al., 2012). Incluso, *Cordyceps javanica* fue moderadamente virulenta contra la polilla gitana *Lymantria dispar* (Linnaeus) (mortalidad 58-100%) al sumergir las larvas en la suspensión de conidios (1×10^8 conidios ml^{-1}) (Shimazu y Takatsuka, 2010).

En el caso de *Beauveria bassiana* el aislado (IDIAP D-Bb1400), alcanzó un TMS de 7.31 días y una CL50 de 5.8×10^6 conidios ml^{-1} , por lo tanto, fue moderadamente menos virulenta y causó una mortalidad inferior a IDIAP RS-Cj006, en las

concentraciones evaluadas, cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre estas y que ambas mostraron un 100% de mortalidad en la concentración 1×10^9 conidios ml^{-1} . Estos resultados, son similares a los obtenidos por González-Dufau et al. (2020), con estos aislados evaluados en *Hypothenemus hampei*; quienes reportan 100 % de mortalidad a los 15 días y Tiempo letal medio (TL50) de 3.98 días para el aislado IDIAP RS-Cj006 y 7.86 días para el aislado IDIAP D-Bb1400.

Bidochka et al. (2002), evaluó 61 aislados de *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 conidios ml^{-1} y reportando un TMS de 3,2 días para *G. mellonella*. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación y puede asociarse a que, la patogenicidad de cada cepa está influenciada por componentes de origen genético (Mena, 1999). Por otro lado, los TMS para *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleurodidae) en donde ninfas fueron tratadas con Aislamientos de *B. bassiana* varían de 5.9 a 7.4 días (Quesada Moraga et al., 2006a). En otros estudios el TMS fue de 5,4 a 14,4 días para 10 aislados de *B. bassiana* en concentraciones de (1×10^7 y 1×10^8 conidios ml^{-1}) para la patogenicidad frente a *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Quesada Moraga et al., 2006b). Además, en adultos de *Agrilus planipennis* (Fairmaire) (Coleoptera: Buprestidae) tratado con tres aislamientos *B. bassiana* (1×10^7 conidios ml^{-1}) (Liu y Bauer, 2006) el TMS fue de 4,2 días.

Es importante mencionar que el potencial patogénico de ambos aislados IDIAP RS-Cj006 y IDIAP D-Bb1400 podría estar influenciado por diversos factores: a)

presencia de adherencias en la superficie de los conidios en unión a la cutícula de insectos (Anand et al., 2009), b) una o más factores de virulencia como quitinasas, proteasas Pr1 y Pr2. (Anand et al., 2009; Santi et al., 2010) y c) presencia de colágeno capa protectora que permite a los hongos superar la inmunidad innata de los insectos cuando llega el hongo en contacto con la hemolinfa (Anand et al., 2009 y Freed et al., 2012). Por lo que es importante seguir evaluando diferentes aislados de hongos entomopatógenos, como las de este estudio, debido a su posible potencial en el control de plagas en la agricultura.

5. CONCLUSIONES.

- La metodología y dieta utilizada en nuestro estudio para la cría y mantenimiento del insecto modelo de estudio *Galleria mellonella*, fue exitoso y garantiza una población permanente para diversas investigaciones.
- El tiempo del ciclo de vida de *G. mellonella* bajo condiciones ambientales locales fue de 62.7 días en promedio, se estableció ocho instares larvarios tomando como referencia el ancho de la exuvia de la cápsula cefálica, la cual osciló entre 0.18 ± 1.39 mm en el instar I hasta alcanzar un ancho de 2.49 ± 4.10 mm en el instar VIII.
- Ambos aislados fúngicos fueron patogénicos contra el V instar de *G. mellonella*, en donde la mortalidad para el aislado IDIAP D-Bb1400 fue de 80, 86 y 100% para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidios ml^{-1} respectivamente y para IDIAP RS-Cj006 osciló entre 90% para la concentración 1×10^7 conidias ml^{-1} y 100% para 1×10^9 conidias ml^{-1} .
- Los aislados utilizadas en esta investigación tienen un gran potencial según nuestros resultados para su futura aplicación en la agricultura y biotecnología.

6. RECOMENDACIONES

- Mantener una cría permanente de *Galleria mellonella* para diversos estudios con diferentes microorganismos biocontroladores de plagas agrícolas.

- Contar con crías establecidas de diversos insectos plagas en la agricultura, para la evaluación del potencial patogénico de diversos hongos entomopatógenos.

- Realizar colectas en diversos de hongos entomopatógenos en diversos puntos de nuestro país, con el propósito de contar con una colección de estos microorganismos y tener siempre este recurso para docencia e investigaciones.

- Continuar evaluando estos y otros aislados de hongos entomopatógenos con gran potencial en el control biológico.

7. REFERENCIAS CITADAS

A, Root. (1976). *Estado de la apicultura* (pp. 670–672).

Abdel-Naby, Ata Llah, Morad, G. y Mohamed A. (1983). Effect of different temperatures, relative humidity and light on the immature stages of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *5th Arab Pesticides Conference*, 94–103pp.

Agrios, G. (2005). *Fitopatología* (2da edición).

Alves, S. (1998). Fungos entomopatogénicos, Controle Microbiano de Insetos. *Editores Fealq, Piracicaba* (pp. 289–382).

Anand, R., Prasad, B. y Tiwary, B. (2009). Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. *BioControl*, 54, 85–92pp.

Aquino De Muro., Elliott, S., Moore, D., Parker, B., Skinner, M., Reid W. y El Bouhssini M. (2005). Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycological Research*, 109(3), 294–306pp.

Badii, M., y Abreu, J. (2006). Biological control, a sustainable of pest. *International Journal of Good Conscience*, 1, 82–89pp.

Barron, G. (2001). *George Barron's Website on Fungi*. Universidad de Guelph, Ontario, Canada. Consultado en línea el 10 de septiembre de 2020, disponible en: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

- Bergin, D., Brennan, M. y Kavanagh K. (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infections*, 5, 1389–1395pp.
- Bergin, D., Reeves, E., Renwick, J. y Wientjes, F. (2005). Superoxide production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. *Infection and immunity*, 73(7), 4161–4170pp.
- Berlanga, A., Adrien, G., Ayala, Z., Serna, D., Montesinos, M. y Rodríguez, J. (2018). Hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. 89(4), 987–1001pp.
- Bidochka, M., Menzies, F. y Kamp A. (2002). Genetic Bassiana, groups of the insect-pathogenic fungus *beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology*, 178, 531–537pp.
- Bukhari, T., Takken, W. y Koenraadt C. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites and Vectors*, 4–23pp.
- Bustillo, P. (2005). El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias*, 29 (110), 55–68pp.

- Cañedo, V. y Ames T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú. Centro internacional de la Papa (CIP).
- Cardoso, A. (2007). Exigencias térmicas de estadios inmaduros de *G. Mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae). *Ecology, Behavior and Bionomics. Neotropical Entomology*, 36(5), 657–661pp.
- Carr, A., Elósegui, O. y Bel P. (2003). Reproducción de dos cepas nativas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith, sobre diferentes soportes líquidos y sólidos. *Fitosanidad*, 7, 7–11pp.
- Carrillo, L. (2005). *Los hongos de los alimentos y forrajes: Estructuras*. Universidad Nacional de Salta. Facultad de Ciencias Agrarias. Consultado en línea el 10 de septiembre de 2020, disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>
- Castillo-López., Zhu-Salzman., Ek-Ramos. y Sword, A. (2014). The Entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field Conditions. *PLoS ONE*, 9(8), 1–8pp.
- Castineiras, A., Pena, J., Duncan, R. (1996). Potential of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as biological control agents of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). *Florida Entomologist*, 79, 458–468pp.

- Chandel, Y., Sharma, S. y Verma, K. (2003). Comparative biology of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L., and lesser wax moth, *Achoria grisella*. *Forest Pest Management and Economic Zoology*, 11, 69–74pp.
- Charnley, A. y Collins, S. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *Environment and Microbial Relationships*, 4, 159–185pp.
- Cotter, G. y Kavanagh, K. (2000). Adherence Mechanisms of *Candida albicans*. *British Journal of Biomedical Science*, 75, 241–249pp.
- Domsch, K., Gams, W. y Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. 1, 860.
- Faria, M. y Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international clasification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256pp.
- Freed, S., Jin Feng-Lian., Muhammad Naeem. y Hussian, A. (2012). Toxicity of Proteins Secreted by Entomopathogenic Fungi against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *International journal of agriculture y biology*, 14(2), 291–295pp.
- Gallo, D., Nakano, S., Silveiro, N., Carvalho, G., Batista, E., Berti, F., Parra, R. y Zucchi, S. (1988). *Manual de entomologia agrícola*. 2a. edição. Editora Agronómica Ceres Ltda., Sao Paulo (pp. 649).

- Garces, E. (2014). Producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, para el control de hormigas cortadoras. Caacupé, Paraguay. *Centro de Investigación Hernando Bertoni*.
- González, G., Santamaría, J., Castrejón, K., Santos, U., Sanjur, M., Santos, U., Herrera-Cirias. y Monzón-Centeno, A. (2020b). Caracterización morfofisiológica de aislados nativos de *B. bassiana* colectados en cafetales de la CNB, Panamá. Sometido a la Revista Científica La Calera para publicación.
- González, G., Caballero, S., G, Contreras., Vergara, G. y Mejía, L. (2015). caracterización morfológica y molecular del aislado endémico RS006, biocontrolador de *Hypothenemus hampei* en panamá. *Revista Ciencia Agropecuaria*, 22, 78–85pp.
- Gryganskyi, A., Humber, R., Smith, M., Miadlikovska, J., Wu, S., Voigt, K., Walther, G. y Vilgalys, R. (2012). Molecular phylogeny of the Entomophthoromycota. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65, 682–694pp.
- Güerri-Agulló, B., Asensio, L., Barranco, P. y Lopez-Llorca, L. (2011). Use of a Solid Formulation of *Beauveria bassiana* for Biocontrol of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) (Coleoptera: Dryophthoridae) Under Field Conditions in SE Spain. *Journal of Microbiology*, 94(4), 737–747pp.
- Gulati, R., Kaushik, H. (2004). Enemies of honeybees and their management- A review. *Agricultural Reviews* 25 (3), 189- 200pp.

Hanumanth, A. y Swamy, B. (2008). Bionomics and biometrics of Greater wax moth *Galleria mellonella* Linnaeus. *Asian Journal of Biological Sciences*, 3(1), 49–51pp.

Hasan, W., Assaf, L. y Abdullah, S. (2012). Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sites and evaluation for their entomopathogenic potential. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum*, 12(1),19–27pp.

<https://www.iasj.net/iasj?func=article&ald=60719>

Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P., Eriksson, O., Huhndorf, S., Kirk, P., Lucking, R., Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P., McLaughlin, D., Redhead, S., Schoch, C., Spatafora, J., Stalpers, J., Vilgalys, R., Aime, M., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G., Castlebury, L., Crous, P., Dai, Y., Gams, W., Geiser, D., Gueidan, C., Hawksworth, D., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R., Hyde, K., I., Koljalg, U., Kurtzman, C., Larsson, K., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Moncalvo, J., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R., Tibell, L. y Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M., Winka, K. y Yao. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509–547pp.

- Hu, Q. (2014). Assessing the potential of entomopathogenic *Isaria javanica* for management of the greenhouse insect pests. *Dissertation of National Taiwan University, Taipei*.
- Humber, R. (2012). Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomopathogenic fungi. *Mycotaxon*, 120, 477–492pp.
- Inglis, G., Goettel, M., Butt, T. y Strasser, H. (2001). Fungi as Biocontrol Agents: Progress, problems and potential. In *Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest* (pp. 23–69).
- Jackman, J. y Drees, B. (1998). A field guide to Texas insects. *Houston: Gulf Publishing Company*.
- Jaronski, S. (2010). Ecological factors in the inundativa use of fungal entomopathogens. *Bicontrol*, 55, 159–185pp.
- Kavanagh, K. y Fallon, J. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, 24, 79–83pp.
- Kirkland, B., Westwood, G. y Keyhani, O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41, 705–711pp.

Knutson, A. y Gilstrap, F. (1990). Life tables and population dynamics of the southwestern corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in Texas corn. *Environmental Entomology*, 19, 684–696pp.

Kopáček, P., Weise, C., Götz, P. (1995). The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 1081–1091pp.

Kouassi, M. (2001). Les possibilités de la lutte microbiology que emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. Universidad de Québec, Montreal, Canadá. *La Revista de Ciencias Ambientales*. Consultado en línea el 10 de septiembre de 2020, disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html

Kouassi, M., Coderre, D. y Todorova, S. (2003). Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *Journal of Applied Entomology*, 127, 421–426pp.

Kwadha, C., Mutunga, J., Irungu, J., Ongamo, G., Ndegwa, P. y Raina, S. (2019). Decanal as a major component of larval aggregation pheromone of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Entomology*, 00, 1–13.

Lacey, L., Grzywacs, D., Shapiro-Ilan, D., Frutos, R., Brownbridge, M. y Goettel, M. (2015). Insect pathogens as biological control agents. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1, 132–142pp.

- Lecuona, R., Papierok, B. y Riba, G. (1996). Hongos entomopatógenos. In *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga* (pp. 35–60).
- Lezama-Gutiérrez, R., John, J., Molina-Ochoa, J., López, E., Pescador-Rubio, A. y Eloise, L. (2014). Occurrence of Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *The Florida Entomologist*, 84(1), 23–30pp.
- Liu, H. y Bauer, L. (2006). Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1096–1103pp.
- Lo Verde, G., Torta, L., Mondello, V., Caldarella, C., Burruano, S. y Caleca, V. (2015). Pathogenicity bioassays of isolates of *Beauveria bassiana* on *Rynchophorus ferrugineus*. *Pest Management Science*, 71(2), 323–328pp.
- Lopes, R., Svedese, V., Portela, A., Albuquerque, A. y Luna-Alves, L. (2011). Virulence and biological aspects of *Isaria javanica* (Frieder y Bally) Samson y HywelJones in *Coptotermes gestroi* (Washmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Arquivos Do Instituto Biológico, São Paulo*, 78, 565–572pp.
- Lozano-Gutiérrez, J. y España-Luna, M. (2008). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the White Grub *Laniifera cyclades* (Lepidoptera: Pyralidae) under Field and Greenhouse Conditions. *Florida Entomologist*, 91(4), 664–668pp.

- Lyon, W. (2007). *Rearing wax worm (Galleria mellonella)*. Ohio State University Extension Fact Sheet. Entomology.
- Mohamed, A. (1983). *Biological and ecological studies on the greater wax moth (Galleria mellonella L.)*, M.sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Minia University, Egypt., (pp. 97).
- Neira, M. (2006). Sanidad apícola, principales enfermedades y enemigos de las abejas en Chile. *Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.*, (pp. 138).
- Neira, M. y Manquian, N. (2004). Apuntes prácticos de apicultura. Material curso: Apicultura PSV 232. *Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.*, (pp. 107).
- Ortiz–Urquiza, A. y Keyhani, N. (2013). *Action on the surface: Entomopathogenic.*
- Quesada-Moraga, E. y Santiago-Álvarez, C. (2008). Hongos Entomopatógenos. *Control Biológico de Plagas, Navarra, España: Phytoma y Publicaciones de La Universidad Pública de Navarra, 237–256pp.*
- Quesada-Moraga, E., López-Díaz, C. y Landa, B. (2014). The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS ONE*, 9, e89278.
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E., Valverde, G. y Santiago-Álvarez, C. (2006). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity, *Biological Control*, 36, 274–287pp.

- Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I. y Santiago-Álvarez, C. (2008). Autodissemination of *Metarhizium anisopliae* between adults of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 47, 115–124pp.
- Quesada-Moraga, E., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Muñoz-Ledesma, F., García-Fernández, P. y Santiago-Álvarez, C. (2009). Los hongos entomopatógenos y sus proteínas insecticidas en el control de plaga de insectos. *III Jornadas de Divulgación de La Investigación En Biología Molecular, Celular y Biotecnología. Córdoba, España.*, 15–19pp.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz, G. y Santiago-Álvarez, C. (2006). Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 1955–1966pp.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. y Lereclus, D. (2012). The Insect as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, 70, 1–7pp.
- Realpe, A., Bustillo, A. y López, N. (2007). optimización de la cría de *Galleria mellonella* para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2), 142–157pp.

- Reinert, J., Knauf, S. y Maranz, B. (1999). Effect of *Beauveria bassiana* fungus on the boxelder and red shouldered bugs (Hemiptera: Rhopalidae). *Florida Entomologist*, 33, 469–474pp.
- Rijo, E., Matos, N. y Barrios, A. (1996). Desarrollo de *Galleria mellonella* alimentada con dieta a base de derivados de la industria azucarera. 12, 61-69pp.
- Ríos–Moreno, A., Garrido–Jurado, I., Resquín–Romero, G., Arroyo–Manzanares., Arce, L., Quesada–Moraga, E. (2016). Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*, 26, 1574–1585pp.
- Roy, H., Streinkraus, D., Eilenberg, J., Hajek, A. y Pell, J. (2006). *Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts*, 51, 331–357pp.
- Samaneh, A., Seyed-Ali, S. y Yobert, G. (2014). Efficacy of *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* L. (Hem.: Aphididae) in laboratory condition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(12), 1454–1458pp.
- Santi, L., Beyes de Silva, W., Berger, M., Guimares, J., Schrank, A. y Vainstein, M. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55, 874–880pp.

- Scott, W., Ludwig, R. (2002). Efficacy of *beauveria bassiana* plus insect attractants for enhanced control of *Frankliniella occidentalis* (thysanoptera: thripidae). *Florida Entomologist*, 85(1), 270–272pp.
- Shimazu, M. y Takatsuka, J. (2010). *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 45(3), 497–504pp.
- Tafoya, F., Zuñiga-Delgadillo, M., Alatorre R., Cibrian, T. y Stanley, D. (2004). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the Cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, 87(4), 536–553pp.
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koire, M., Maniania, N., Monzón, A., Rangel, D. y Roy, H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2, 149–159pp.
- Vilcinskas, A. (2010). Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insect. *Virulence*, 1, 206–214pp.
- Williams, J. (1990). *Insects: Lepidoptera (moths)* In: Morse, R y Nowogrodzki, R. (eds). *Honey bee pests, predators, and diseases*. 1, 96–120pp.
- Williams, J. (1997). *Insects: Lepidoptera (moths)*. In *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases* (121–141pp).

- Wraight, S., Carruthers, R., Jaronski, S., Bradley, C., Garza, C., Galaini-Wraight, S. (2000). Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17, 203–217pp.
- Wraight, S., Jackson, M. y De Kock, S. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *BioControl*, 253–288pp.
- Yang, Y., Huang, M., Beattie, G., Xia, Y., Ouyang, G. y Xiong, J. (2006). Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: a status report for China. *International Journal of Pest Management*, 52, 343–352pp.
- Zenner, I. y Posada, J. (1992). Manejo de insectos, plagas y benéficos, de la palma africana. Bogotá, ICA. en (*Manual de Asistencia Técnica No. 54*) (pp. 124).

8. ANEXOS



Anexo 1. Determinación de la cantidad de instares de *G. mellonella*, tomando como referencia la exuvia de la cápsula cefálica.



Anexo 2. Colonización y emergencia de estructuras fúngicas del aislado IDIAP D-Bb1400, sobre larva de *G. mellonella*.



Anexo 3. Sintomatología (melanización) ocasionada por la infección del aislado IDIAP RS-CJ006.



Anexo 4. Larva colonizada por el aislado IDIAP D-Bb1400.