

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

APLICABILIDAD BIOCONTROLADORA, ENDÓFITA Y PATOGENICA
DE CEPAS NATIVAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

GEOVANNY MONTOYA

4-801-2461

MAGALY PINZÓN

4-805-2275

DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

APLICABILIDAD BIOCONTROLADORA, ENDÓFITA Y PATOGENICA
DE CEPAS NATIVAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

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

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

APROBADO:

DR. ALEX RÍOS MORENO

DIRECTOR

DR. JUAN MIGUEL OSORIO

ASESOR

MGTR. SIMÓN VÁSQUEZ

ASESOR

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2023

AGRADECIMIENTOS:

Como punto de inicio agradeciendo a Dios sobre todas las cosas, por la oportunidad de habernos permitido llegar hasta esta etapa de nuestras vidas, la cual es decisiva para convertirnos como profesionales en las ciencias agrícolas e investigación, además a nuestros familiares que han sido indispensables para el apoyo y aliento para continuar nuestro objetivo.

Agradecer principalmente a nuestro asesor el Dr. Alex Ríos por brindarnos su dedicación, tiempo y conocimiento como investigador para llevar a cabo nuestro tema de tesis, el cual ha sido decisivo para determinar un punto de inicio donde pudimos desarrollar un tema de investigación en el que a futuro sea de enfoque primordial en el aprovechamiento de la fauna benéfica la cual es uno de los retos que conllevará las nuevas generaciones.

Además, nos gustaría agradecer al Dr. Reynaldo Vargas por su apoyo y virtudes para desarrollar todo lo concerniente en el ámbito estadístico ya que es una parte clave para evaluar los resultados obtenidos a lo largo de nuestra investigación, además de proveer de insumos de laboratorio para poder culminar los ensayos.

Al IDIAP (Instituto de investigación agropecuaria de Panamá) sede Divisa por ser parte nuestra investigación en especial al Dr. Vidal Aguilera y el Dr. Anovel Barba, al donarnos cepas nativas de hongos entomopatógenos (HE) y la capacitación adecuada para la multiplicación y conservación de los aislados de HE.

DEDICATORIA:

Esta tesis va dedicada en especial para mi madre, Jesika Saucedo, la cual ha sido el motor que me impulso a seguir adelante a pesar de las adversidades en todo lo largo de mis estudios, ya que, gracias a sus palabras de aliento he podido llegar hasta este punto de mi vida como profesional.

A mis hermanos y sobrinas los cuales han sido un punto de apoyo en tomas de decisiones para poder continuar con mis estudios y así mantenerme y nunca desistir.

Agradecer infinitamente a mis compañeros de universidad que en conjunto hemos podido avanzar por igual, sabiendo entendernos para así poder enfrentar con cada una de las adversidades que se nos presentaron día a día en nuestra vida universitaria, teniendo siempre presente que para lograr un objetivo es crucial la comunicación y el trabajo en equipo.

Y a Dios por darme la sabiduría y entendimiento para tomar en el momento oportuno las decisiones correctas que hoy en día son el reflejo de lo logrado en mi proceso de formación.

Geovanny G. Montoya S.

DEDICATORIA:

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme realizar mis metas personales y poder lograr con éxito la culminación de mi carrera profesional para poder encaminar mi futuro al ámbito laboral

Teniendo presente la gratificación de poder dedicarle esta tesis principalmente a mi abuela, Aura Bonilla, por siempre apoyarme y estar para mí en cada momento de mi vida siendo la razón de nunca darme por vencida para poder ser un motivo más de felicidad y orgullo tras este logro obtenido.

Y sin lugar a duda agradezco a mi madre Melisa Forero por encaminarme y ser mi guía en el proceso de formación, dándome siempre las herramientas necesarias para dar cada uno de mis pasos y poder superarme.

Finalmente, también dedico este trabajo en agradecimiento a aquellos compañeros que se transformaron en amistades sinceras e incondicionales, en especial a Melany Pittí, gracias por el apoyo brindado en el camino a este logro tan anhelado.

Magaly M. Pinzón F.

RESUMEN

Con la aplicación de cepas nativas de hongos entomopatógenos (HE) se ha logrado conseguir un potencial prometedor tanto como controlador endófito y patogénico en el cultivo de ají contra la plaga *Bemisia tabaci*. Debido a su capacidad de daño, el insecto ocasiona una alerta en los agricultores por las pérdidas que ocasiona anualmente, siendo necesario presentar alternativas biológicas que demuestren su eficacia de control para hacerle frente a la problemática actual en Panamá y de esta manera disminuir la carga química utilizada actualmente en nuestros campos de producción. Es por esta razón que nuestro estudio adquiere importancia para ser desarrollado tanto a nivel de laboratorio como en campo. Se pudo obtener resultados alentadores con el uso de aislados de *Beauveria bassiana* (IDIAP Bb 8-1) y *Metarhizium anisopliae* (IDIAP Mt2) obtenidos en el instituto de innovación agropecuaria de Panamá (IDIAP). También se evaluó la patogenicidad de estas cepas utilizando larvas del quinto instar de *Galleria mellonella* las cuales fueron sumergidas durante 20 segundos en una suspensión de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹. La mortalidad se evaluó utilizando el estimador de supervivencia no paramétrico de Kaplan meier dando como resultado un 80% \pm 3.33 de mortalidad para *B. bassiana* y un 56.6% \pm 2.69 de mortalidad para *M. anisopliae* demostrando la eficacia a nivel de laboratorio. Para la evaluación endófito se inoculó los plantones de ají con las cepas a una suspensión de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹, se procedió a tomar muestras al azar a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de haber aplicado los HE, utilizando la prueba Chi-cuadrado se obtuvo el mayor porcentaje de colonización en hoja y tallo a las 72 horas con un 90% y 74.7% respectivamente en el caso de *B. bassiana* y para el caso de *M. anisopliae* a las 96 horas con un 86% y 76.7% respectivamente. Se obtuvo diferencia significativa en la colonización de la raíz mostrando mayor porcentaje a las 120 horas con un 57% para *B. bassiana* y un 30% para *M. anisopliae*. Para la evaluación de la capacidad biocontroladora en ambiente controlado la inoculación de las cepas de HE se realizó cuando las ninfas de *B. tabaci* se encontraron en el segundo instar mediante el método de aspersión. La prueba Chi-cuadrado muestra que no hay diferencias significativas teniendo en cuenta la media

de los tratamientos para el caso de *B. bassiana* con un 30.5% mientras que *M. anisopliae* presentó un 16.7%, estos porcentajes nos indican una baja mortalidad. Resultados como estos resaltan la importancia de continuar con el uso del efecto demostrado por ambas cepas para la agricultura.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, control Biológico, endófito, *Metarhizium anisopliae*, patogenicidad.

ABSTRACT

With the application of native strains of entomopathogenic fungus (EF) it has been possible to obtain a promising potential as an endophytic and pathogenic controller in pepper crops against the *Bemisia tabaci* pest. Because of its ability to cause damage, the insect causes an alert among farmers due to the amount of losses it causes per year, which has led to the necessity to suggest biological alternatives that demonstrate its veracity of control to deal with the ongoing problem in Panama and this way decrease the chemical load currently used in our crops. Hence, this study becomes important to be developed whether in a laboratory or on field. It was possible to get encouraging results in this study by using *Beauveria bassiana* (IDIAP Bb 8-1) and *Metarhizium anisopliae* (IDIAP Mt2) isolates which were obtained from Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (Agricultural Research Institute of Panama). The strains' pathogenicity was evaluated using fifth instar larvae of *Galleria mellonella* which were immersed for 20 seconds in a suspension of 1×10^8 conidia/ mL⁻¹. Mortality was assessed using the Kaplan Meier's nonparametric estimator of survival resulting in $80\% \pm 3.33$ mortality for *B. bassiana* and $56.6\% \pm 2.69$ mortality for *M. anisopliae* proving its effectiveness at laboratory level. For the endophytic evaluation, the pepper seedlings were inoculated with the strains at a suspension of 1×10^8 conidia/ mL⁻¹, then samples were taken randomly at 24, 48, 72, 96 and 120 hours after applying the EF. Using the Chi-squared test, the highest percentage of colonization was obtained in the leaves and stems after 72 hours with 90% and 74.4% respectively in the case of *B. bassiana*, and in the case of *M. anisopliae* after 96 hours with 86% and 76.7% respectively. A significant difference was obtained in the colonization of the roots, showing a higher percentage after 120 hours with 57% for *B. bassiana* and 30 % for *M. anisopliae*. For the evaluation of the biocontrol capacity in a controlled environment, the inoculation of the EF strains was carried out when *B. tabaci* nymphs were found in the second instar using the spraying method. According to the Chi-squared test, there are no significant variations considering the average of the treatments for the case of *B. bassiana* with 30.5%, meanwhile *M. anisopliae* showed 16.7%. These percentages

indicate low mortality. Results like these highlight the importance of promoting the use of the effect demonstrated by both strains for agriculture.

Keywords: *Beauveria bassiana*, biological control, endophyte, *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Antecedentes	2
1.3 Justificación	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 General	5
1.4.2 Específicos	5
1.5 Hipótesis	5
1.6 Alcances y limitaciones del estudio	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos	8
2.1.1 Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos	9
2.2 <i>Beauveria bassiana</i>	10
2.2.1 Generalidades	10
2.2.2 Descripción morfológica de la colonia	11
2.3 <i>Metarizhium anisopliae</i>	12
2.3.1 Generalidades	12
2.3.2 Descripción morfológica de la colonia	13

2.4 Mosca Blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	13
2.4.1 Generalidades	13
2.4.2 La morfología de los distintos estados de <i>B. tabaci</i>	14
2.4.3 Importancia económica	15
2.4.4 Daños que causa	16
2.5 Cultivo de ají (<i>Capsicum anunn</i>)	16
2.5.1 Principales plagas en el cultivo de ají	18
2.6 Hongos endófito	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 materiales	20
3.2 metodología	21
4. RESULTADOS	27
4.1 Caracterización morfológica de los aislados nativos <i>Beauveria bassiana</i> (IDIAP Bb 8-1) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (IDIAP Mt2)	28
4.2 Patogenicidad de cepas monosporicas de <i>Beauveria bassiana</i> (IDIAP Bb 8-1) y <i>Metarhizium anisopliae</i> (IDIAP Mt2) sobre larvas de <i>Galleria Mellonella</i> en condiciones de laboratorio	29
4.3 Evaluación de las cepas <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> para determinar su potencial endófito en hojas, tallo y raíz de ají	30
4.4 Capacidad biocontroladora de las cepas <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la mosca blanca en el cultivo de ají en ambiente semi-controlado	32
4.5 DISCUSIÓN	33
5. CONCLUSIÓN	41

6. RECOMENDACIONES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Bemisia tabaci</i> https://promip.agr.br/mosca-branca-praga-polifaga-dificil-controle/	14
Figura 2. (A) Extracción de medio de cultivo para su conservación; (B) HE en conservación.....	22
Figura 3. (A) <i>G. mellonella</i> sumergidas en una suspensión 1×10^8 conidios/ mL ⁻¹ ; (B) Cámara húmeda con larvas muertas; (C) Crecimiento fúngico de <i>B. bassiana</i> ; (D) vista en estereoscopio de <i>M. anisopliae</i>	23
Figura 4. (A) Vista externa del invernadero; (B) Vista interna del invernadero.	24
Figura 5. (A) Aspersión de plantones con suspensión de cepas de HE; (B) Desinfección de plantones en cámara de flujo laminar; (C) Fragmentos de hoja, tallo, y raíz en medio PDA (D) Crecimiento fúngico <i>B. bassiana</i> en fragmentos.....	25
Figura 6. Trampas clips	26
Figura 7. (A) Tutoreo en plantones ají; (B) Aspersión en plantones con cepas de HE; (C) Vista con microscopio digital de ninfas con crecimiento fúngico.	27
Figura 8. (A) Colonia monospórica de <i>B. bassiana</i> multiplicada sobre un plato Petri con medio de cultivo; (B) Vista microscópica de la cepa.	28
Figura 9. (A) Colonia monospórica de <i>M. anisopliae</i> multiplicada sobre un plato Petri con medio de cultivo; (B) Vista microscópica de la cepa	29
Figura 10. Porcentaje de supervivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> inmersas en suspensiones de cepas de HE a una concentración de 1×10^8 conidios/ mL ⁻¹ de los aislados IDIAP Bb 8-1 y IDIAP Mt2.....	30
Figura 11. Porcentaje de colonización de las evaluaciones realizadas después de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. de la inoculación, en diferentes partes de los plantones de ají (hoja, tallo y raíz), asperjadas con una suspensión de 1×10^8 conidios/ mL ⁻¹ por cada cepa. (A) <i>B. bassiana</i> (B) <i>M. anisopliae</i>	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Taxonomía de <i>Beauveria Bassiana</i>	11
Tabla II. Taxonomía de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
Tabla III. Taxonomía de <i>Bemisia Tabaci</i>	13
Tabla IV. Taxonomía del ají	17
Tabla V. Mortalidad (promedio \pm SE) %, en una concentración de 1×10^8 conidios/mL ⁻¹	30
Tabla VI. Porcentajes mortalidad (promedio \pm SE) de ninfas de segundo estadio mediante el método de aspersión con cepas de HE a una concentración de 1×10^8 conidios/ mL ⁻¹	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Vista en el estereoscopio con presencia de crecimiento micelial de <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>G. Mellonella</i>.....	53
Anexo 2. Vista en el estereoscopio con presencia de crecimiento micelial de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>G. Mellonella</i>	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema:

El incremento de la población ha aumentado drásticamente en los últimos años y su relación con la producción de alimentos va de la mano, teniendo en cuenta las repercusiones ocasionadas al medio ambiente por el uso masivo de agroquímicos con el fin de tener mayor rendimiento por hectárea cultivada. Cabe mencionar que al principio el uso de agroquímicos tuvo un gran éxito debido a que reflejó resultados inmediatos y a un bajo costo y con posibilidades de producción en masa, teniendo un auge al comienzo de la revolución verde, pero este no duraría permanentemente por motivos puntuales los que se vieron reflejado en los próximos años:

- Disminución de la efectividad de control
- Los insectos plagas desarrollan resistencia debido al uso continuo de insecticidas
- Se convirtieron en contaminantes para los sistemas bióticos (animales y plantas) abióticos (suelo, aire, agua)
- Presentaron un peligro para la salud pública

Es por esto, que trae como motivo la investigación de alternativas de biocontrol enfocada en una producción que vaya de la mano con el medio ambiente, enfatizándose el uso de hongos entomopatógenos, ya que estos presentan ventajas para el control de insectos plagas en los cultivos de importancia a nivel mundial, debido a que se caracterizan por infectar todas las etapas de la vida de los insectos, se encuentran en hábitats acuáticos, terrestres y subterráneos e invaden el insecto por vía cutánea hasta causar su muerte y así evitar que los insectos plaga se alimenten de las plantas afectando: hojas, raíces y tallos provocando una disminución en la producción.

La particularidad del uso de HE tiene éxito debido a la gran diversidad de insectos que controla, para ello es necesario el cultivo de hongo para la obtención de una cepa pura y así poder aplicarlo para obtener buenos resultados.

1.2. Antecedentes:

En la Comarca Ngäbe-Buglé se realizó un estudio para caracterizar morfofisiológica y molecularmente aislados de HE nativos y seleccionar los más promisorios, para controlar la broca del café, *Hypothenemus hampei*, siendo esta una de las principales plagas en el cultivo de café. La identificación molecular se hizo mediante la secuenciación de la región del espaciador transcrito interno (ITS). Se identificaron 13 aislados pertenecientes a *Beauveria bassiana* (Vullevein), y un aislado de *Purpureocillium lilacinum* (Thom). En este estudio se concluye que los aislados de *B. bassiana* D-Bb1400, D-Bb1350 y D-Bb1398, presentaron alto potencial patogénico para el control de *H. hampei*, alta producción de conidios y una germinación favorable, para ser incorporados como parte de una estrategia de manejo biológico de la broca del café. El conjunto de aislados de *B. bassiana* mostraron diferencias entre sí en cuanto a la mortalidad de *H. hampei*, no obstante, el análisis filogenético no muestra variación genética, ubicándose en un mismo grupo (González et al., 2021).

En la investigación realizada por Martínez (2009), basada en la selección de HE para el control biológico de áfidos (*Toxoptera citricida*) en la provincia de Coclé se realizó muestreos de insectos infectados, donde se aisló una cepa de *Verticillium lecanii* EM-406 el resto de las cepas *Beauveria bassiana* PC-70, *Metarhizium anisopliae* AC 109, *Verticillium lecanii* AC 110, fueron facilitadas por el laboratorio de Biotecnología microbiana (Lab. 214 edificio de Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá). Se evaluó la viabilidad de cada cepa por medio de la prueba de germinación en donde *B. bassiana* PC 70 y *V. lecanii* AC 110 presentaron los mayores niveles. En la prueba de patogenicidad *B. bassiana* presentó el mayor porcentaje de mortalidad. Los resultados indicaron que la cepa *B. bassiana* PC 70 tiene un mayor potencial como control biológico del insecto plaga *T. citricida* de los cultivos cítricos.

El fitófago *Bemisia tabaci* (Gennadius) es una plaga agrícola importante dentro de los insectos polívoros, siendo un vector de enfermedades y virus que afecta la calidad y rendimiento de cultivos hasta del 94%. Debido al uso indiscriminado de insecticidas, la mosca blanca ha desarrollado resistencia contra diferentes grupos de plaguicidas

sintéticos por ello se requiere medidas de control eficaces que no causen efectos nocivos para el medio ambiente, la salud del hombre y la agricultura. Entre estas alternativas se encuentra los biocontroladores microbianos que permite un manejo de plagas sostenibles y sustentables. El estudio realizado por Gualsaqui (2022), enfocado en la aplicación del HE, *B. bassiana* (Bálsamo) evaluó tres tratamientos en concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 conidios/ mL⁻¹, en las etapas fenológicas de *B. tabaci* (ninfa I, ninfa II, ninfa III y adulto) en condiciones de laboratorio donde determinó la patogenicidad y su efectividad. Los resultados mostraron que *B. bassiana* con el tratamiento 1×10^6 conidios/ mL⁻¹, mostró una superioridad en comparación con el resto de los tratamientos alcanzando el máximo del 98% de mortalidad a las 72 horas en ninfa II y en estado adulto alcanzando un máximo del 84% en el mismo tiempo, lo que se sugiere que puede controlar adecuadamente el desarrollo de ninfas y adulto siendo una alternativa de control biológico.

Durante los últimos 15 años, las moscas blancas han pasado de ser plagas secundarias a ser la plaga de mayor importancia en un gran número de cultivos, tanto en campo abierto o bajo invernaderos alrededor del mundo (Carvajal, 2021). La gravedad de los daños ocasionados por esta plaga y la dificultad para controlarla han obligado a los investigadores y productores, a realizar grandes esfuerzos en la búsqueda de alternativas para su manejo. El control biológico de plagas consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos con la capacidad de controlar los insectos plaga. El empleo de entomopatógenos es una técnica milenaria que utilizaron culturas como la China en el siglo III (Mendoza, 2013). Sin embargo, dejó de practicarse con el origen de la revolución verde, que usa el control químico de plagas, enfermedades y malezas. El uso del control biológico intenta restaurar el equilibrio ecológico mediante la utilización de organismos vivos para reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii, 2006).

En los últimos años, se ha descubierto que todas las plantas hasta el momento estudiadas presentan colonización de diferentes microorganismos endófitos. Entre estos microorganismos se han detectado algunos HE como *B. bassiana* y *M. anisopliae*. (Clifton et al., 2018). Estos dos géneros se han documentado como endófitos en un

importante número de especies vegetales, destacando hortalizas como tomate, pepino, pimiento, ají, repollo, coliflor, brócoli y lechuga (Barra et al., 2018).

1.3 Justificación:

El uso de HE ha sido de gran importancia en el control de insectos plagas debido a su modo de acción, el cual comienza con la germinación de la espora y penetración en el hospedante a través de la cutícula, seguido de una rápida proliferación de las células fúngicas en el interior del insecto con resultado final de muerte. De esta forma se logra tener éxito en el control de insectos teniendo un amplio rango hospedante que incluye áfidos, moscas blancas, trips, termitas, langostas, coleópteros, lepidópteros, dípteros, himenópteros entre otros. Los géneros más importantes son: *Aschersonia*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomurea*, *Paecilomyces* y *Verticillium*. Con el uso de los HE, además de promover la muerte del insecto, aportan beneficios, ya que no contaminan al medio ambiente, no destruyen insectos benéficos, no son tóxicos para el ser humano, no desarrollan resistencia y no dejan residuos en los alimentos (Maranhão & Maranhão, 2013).

Por esa razón es necesario realizar investigaciones que involucren fases experimentales, pruebas de laboratorio, determinación estadística para así poder aportar resultados útiles con el fin de obtener cepas que tengan un buenos resultados de patogenicidad, puesto que la efectividad del empleo de los hongos entomopatógenos está determinada por el nivel de pureza de la espora fúngica y del uso adecuado de propágulo, formulado, aplicación en la dosis y tiempos apropiados y condiciones ambientales.

Pretendemos que los resultados de nuestra investigación sean de apoyo para fines educativos, formación y promoción de futuras investigaciones que ofrezcan alternativas sustentables que garanticen la seguridad alimentaria.

Objetivos:

1.2.1. General:

- Determinar el potencial endófito y patogénico que presentan las cepas nativas de hongos entomopatógenos.

1.2.2. Específicos:

- Multiplicar las cepas de aislados monospóricos nativos de HE.
- Evaluar sobre larvas de *Galleria mellonella* la capacidad patogénica de aislados nativos de HE.
- Evaluar la actividad endófito de aislados nativos en *Capsicum annuum* en condiciones semicontroladas.
- Diagnosticar el potencial biocontrolador en *Bemisia tabaci* con cepas de HE.

1.3. Hipótesis:

- **Hipótesis (a):** Poseen acción biocontroladora, endófito y patogénica los aislados nativos de HE.
- **Hipótesis (0):** No poseen acción biocontroladora, endófito y patogénica los aislados nativos de HE.

1.4. Alcances y limitaciones del estudio:

Pretendemos obtener HE con el suficiente potencial para el control microbiano de insectos hospedantes, teniendo en cuenta los distintos estados de desarrollo y su comportamiento bajo un ambiente controlado. El éxito de la cepa del hongo dependerá de la patogenicidad y persistencia que presente al momento de atacar al insecto plaga queremos lograr iniciar una colección de HE debido a que actualmente la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, no cuenta con una. Lo cual es muy importante para el desarrollo de diferentes líneas de investigación, sobre todo en

su patogenicidad, carácter endófito, actividad biológica e insecticida de sus proteínas y metabolitos secundarios, para su futura aplicación en la agricultura y biotecnología.

Una de las limitaciones en el desarrollo de la investigación es en el proceso de aislamiento por la falta de espacio y equipo de laboratorio disponible para llevar a cabo la multiplicación de hongos, el cual es primordial para realizar ensayos que implican la manipulación de organismos vivos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

García et al. (2008), indica que, los HE constituyen uno de los grupos de mayor importancia en el control biológico de insectos. Estos organismos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina. Tienen un gran potencial como agentes de control, constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos. Ocurren frecuentemente en la naturaleza y a menudo causan reducciones significativas en poblaciones de insectos, incluyendo especies plaga. Se conocen alrededor de 100 especies de hongos con efectos insecticidas, sin embargo, solamente cerca de 20 especies han sido estudiadas como agentes de control y su desarrollo comercial ha sido lento. El uso de estos hongos contra los insectos fue sugerido desde hace muchos años, cuando en 1879 se consideró *M. anisopliae* y en 1888, *Isaria destructor* para el control del picudo de la remolacha *Cleonis punctiventris* (Carballo, 2004).

La infección natural comienza cuando el insecto entra en contacto con el hongo al transitar por sustratos que este ha colonizado, como en el caso del suelo, el agua o las partes aéreas de las plantas. De esta manera, las unidades infectivas (conidios) se adhieren a la superficie de la cutícula del insecto, a través de fuerzas hidrófobas, debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas. Estos hongos inician su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, comenzando el hongo a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica comenzando por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo. Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección (Pucheta et al., 2006). También se da la penetración del HE cuando agentes entomófagos, depredadores y parasitoides, pueden encontrar

y consumir insectos infectados por HE en cuyo caso se exponen no sólo al inóculo fúngico, sino también a diferentes metabolitos secundarios secretados en el insecto hospedante por el hongo (Rodruiges de Castro et al., 2013; Resquín-Romero et al., 2016; Ríos-Moreno et al., 2017). No obstante, estos microorganismos producen una gran cantidad de metabolitos secundarios, químicamente diversos, algunos de los cuales son muy potentes desde el punto de vista biológico, causan severas reacciones adversas en otros organismos, eliminan la competencia de los nutrientes y facilitan el establecimiento del patógeno. Se conoce que los mismos contribuyen a la modificación de la integridad estructural del hospedero, a inhibir el proceso selectivo o a sus enzimas y a interferir con su sistema regulador; además de realizar funciones completamente diferentes dentro de la célula antes de ser secretados, como facilitar el movimiento de los iones a través de las membranas (Borges et al., 2010).

Los HE presentan un amplio espectro de huéspedes (Faria & Wraight, 2007), intervalo geográfico y potencial para el control de insectos plaga; por estas razones es importante coleccionar, purificar, caracterizar y conservar el germoplasma de la mayor variedad de sitios y especies. Al igual que con otros organismos, la conservación de cepas en colecciones de referencia debe ser prioritarios, ya que algunos genotipos pudieran perderse debido a cambios ambientales locales (Hernández et al., 2011).

2.1 Ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos

Para el control de insectos plaga se han desarrollado bioinsecticidas a base de HE para controlar diversas plagas, ya que estos se multiplican y dispersan dentro del mismo cultivo, favorecen la acción reguladora de la población insectos-plaga, sin embargo, estos también poseen desventajas, debido a que son organismos vivos, su manejo y almacenamiento presentan limitaciones. El hongo *B. bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plagas y es la especie de entomopatógenos comercialmente más utilizados alrededor del mundo. *M. anisopliae*, al igual que *Beauveria*, es uno de los hongos entomopatógenos más comunes, con una distribución mundial (Medrano & Tercero, 2019). Ejemplos de estos productos de probada efectividad lo constituyen los bioinsecticidas Mycotrol ES®, Naturalis-L®,

Mycotech®, Conidia® (*Beauveria bassiana*), Green Guard® a base de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Gama et al., 2008).

- **Ventajas:**

Algunas de las ventajas que presentan los HE para ser utilizados en programas de control microbiano de insectos son: alta especificidad, dispersión natural y posibilidad de cultivo *in vitro*, manteniendo la patogenicidad, inocuidad para vertebrados y la posibilidad de provocar un control permanente una vez establecidos en el ambiente. Otra ventaja importante que presentan estos microorganismos es que la infección generalmente se produce por contacto, a través del tegumento de los insectos, no siendo necesaria su ingesta, siendo este un factor importante en programas de control de insectos (St. Leger et al., 2011). Además, los HE se multiplican y dispersan dentro del mismo cultivo favoreciendo la acción reguladora de la población de insectos-plaga, una vez establecido el entomopatógeno en el área, mantiene la población de la plaga por debajo de los niveles de daño económico, la aparición de resistencia en los insectos hacia los patógenos es extremadamente baja, comparada con la alta probabilidad de adquirirla, si se usarán agroquímicos (Chiriboga et al., 2015).

- **Desventajas:**

Por su especificidad, sólo atacan a un número restringido de insectos, su efectividad se ve afectada por condiciones ambientales como: sensibles a temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Además, requiere de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar perder su patogenicidad. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente, alcanzan el nivel de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y el ambiente (Gerding & France, 2016).

2.1.1 Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos

Algunos HE son bastantes específicos, diversos estudios sobre efectos secundarios han indicado que no se pone en riesgo a organismos acuáticos, poco o ningún impacto sobre artrópodos terrestres y no afecta vertebrados al inhalar las esporas (Leucona,

1996). En nuestro país, el IDIAP ha contribuido al desarrollo integral y sostenibilidad de las alternativas de control biológico para el uso la agricultura, ha generado productos pretecnológicos a base de hongos entomopatógenos nativos para el control de plagas de los principales cultivos. Los hongos entomopatógenos nativos son enemigos naturales presentes en agroecosistemas y constituyen un recurso de gran interés para un manejo agroecológico (González, 2022).

Los HE presentan un reconocimiento cada vez mayor en la biodiversidad de los ecosistemas donde prestan importantes servicios ecosistémicos tanto en la producción agrícola como en el control biológico, por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos (Motta & Murcia, 2011).

2.2 *Beauveria bassiana*

2.2.1 Generalidades:

En la tabla I se observa la taxonomía. *Beauveria bassiana* infecta a más de 200 especies de insectos, entre los que se destacan hormigas, gusanos, áfidos, ácaros y escarabajos (Chiriboga et al., 2015). Se caracteriza porque los conidios pueden ser globosos, subgloboso o elipsoidales formados en densos conidióforos. *B. bassiana* es un género de hongos anamórficos cosmopolitas, habitantes del suelo, necrótrofos, patógenos facultativos de artrópodos, que se les puede encontrar también como saprótrofos y como endófitos en plantas (Nussenbaum, 2014). La germinación de los conidios ocurre en un periodo de 12 horas después de la inoculación, el hongo penetra frecuentemente vía tegumento debido a la acción mecánica y enzimática que dura cerca de 12 horas, después de 72 horas el insecto está totalmente colonizado (Portalanza, 2011). Es un HE que produce una toxina de alto peso molecular llamada beauvericina sus esporas son ovales, tienen actividad proteolítica y es soluble en agua, siendo una de las primeras toxinas reportadas en extractos miceliales de *B. bassiana* y es producida dentro del hemocele. Una vez que los conidios penetran la cutícula del insecto la colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea. Las toxinas causan la muerte del insecto, debido a la

degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Buenrostro, 2012).

Tabla I. Taxonomía de *Beauveria Bassiana*

Taxonomía

Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Clavicipitaceae
Género:	<i>Beauveria</i>

Especie: *bassiana*

Fuente: (Espinoza, 2017)

2.2.2. Descripción morfológica de la colonia:

Las colonias en papa dextrosa agar (PDA), a los 14 días son algodonosas a polvorientas y blancas, al tiempo se vuelven amarillentas y cremosas. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor.

Descripción microscópica: los conidióforos son de 1-2 μ de diámetro donde nacen células conidiógenas en acumulaciones grandes, las cuales están aglomeradas formando grupos compactos grandes y otras veces están solitarias, en forma de botellitas de 3-6 x 3-5 μ . En ciertos casos, éstas se ramifican formando células conidiógenas secundarias. Al final de las células, se forma un raquis denticulado de hasta 20 μ de longitud y 1 μ de diámetro, que soporta los conidios. Finalmente, los conidios son hialinos, globosos a subglobosos, de 2 - 3 x 2 - 2.3 μ (Cañedo & Ames, 2004).

2.3 *Metarhizium anisopliae*

2.3.1 Generalidades:

Ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Entre las plagas afectadas por este hongo se encuentran algunos lepidópteros y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco, pero se torna verde cuando el hongo esporula (Soto, 2008). Las destruxinas son los metabolitos secundarios más prevalentes producidos por especies de *Metarhizium spp.* Las destruxinas más abundantes, y de interés insecticida, son las destruxinas A, B y E, Estos péptidos son tóxicos, y causan debilitamiento del sistema inmune del huésped, afectando el sistema muscular y los túbulos de Malpighi, afectan la excreción y conducen al insecto a limitar su alimentación, movilidad y mecanismo de defensa conductual (García, 2022).

Tabla II. Taxonomía de *Metarhizium anisopliae*

Taxonomía

Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Clavicipitaceae
Género:	<i>Metarhizium</i>
Especie:	<i>anisoplae</i>

Fuente: (Gandarilla, 2012)

2.3.2 Descripción morfológica de la colonia:

En el medio de cultivo papa-dextrosa-agar, en el haz de las placas de Petri las colonias son blancas cuando jóvenes, pero al madurar el matiz se torna verde aceituna, en el envés su matiz va de mostaza a café oscuro (Merino, 2017).

Descripción microscópica: el conidióforo nace del micelio y es ramificado irregularmente con dos a tres ramas en cada septo; de 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 μ de diámetro. Sus fiálides cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice; miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro. Los conidios pueden ser unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo que miden 3.5 a 9 μ de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Galán, 2012). Siendo características físicas de esta especie en la cual cumple con la tabla III para su taxonomía.

2.4 Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*)

2.4.1 Generalidades:

La mosca blanca es una de las plagas más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde afecta más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres (Cuellar & Morales, 2006). La mosca blanca fue reportada por primera vez en nuestro continente en 1894, en los Estados Unidos de América. En 1981, altas densidades de este Homóptero fueron determinadas como vectores de virus que causaron enfermedades en las comunidades agrícolas. Aunque posiblemente la especie estuvo presente antes, recién a partir de 1983 fue mencionada para Panamá en la región de Azuero, afectando el tomate en los años 1991 y 1992. Algunos cambios climáticos favorecieron el aumento poblacional del complejo de plagas en los cultivos de importancia económica para exportación, principalmente cucurbitáceas (Carreiro, 1994).

Tabla IV. Taxonomía de *Bemisia Tabaci*

Taxonomía

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda
 Clase: Insecta
 Orden: Homoptera
 Suborden: Sternorrhyncha
 Superfamilia: Aleyrodoidea
 Familia: Aleyrodidae
 Género: *Bemisia*
 Especie: *tabaci*

Fuente: (quezada, 2006)

2.4.2 Morfología de los distintos estados de *B. tabaci*, según Tremblay (1981):



Figura 1. Ciclo de vida de *Bemisia tabaci* <https://promip.agr.br/mosca-branca-praga-polifaga-dificil-controle/>

Adulto: las hembras son de color amarillo-azufre con el cuerpo y alas revestidos de secreción cérica pulverulenta blanca. Longitud de 0.9 a 1 mm y anchura de 0.32 mm. ojos rojo-oscuros a negros, antena con siete artejos. Los machos solo se diferencian de las hembras en la genitalia. Las alas se posicionan casi paralelas al cuerpo.

Pupa: también llamada ninfa de cuarto estadio o N4, presenta color amarillo pálido, contorno oval ancho, con 0.75 mm de longitud por 0.4-0.46 mm de anchura; con frecuencia el margen presenta ondulaciones anchas y poco profundas. La porción central presenta un número variable de cerdas de las cuales son constantes cuatro pares, observables al microscopio.

Ninfas: las de primero estadio (N1) tienen color blanco verdoso, setas marginales y microsetas, tres pares de patas bien desarrolladas, 0.26 mm de longitud. Las ninfas de segundo estadio (N2) son ovales de color blanco verdoso, margen crenulado con tres pares de setas, ojos pequeños e inconspicuos, longitud 0.36 mm y anchura 0.24 mm. Las ninfas de tercero estadio (N3) son semejantes a la anterior con dimensiones de 0.53 mm de longitud y 0.36 mm de anchura.

Huevo: elíptico asimétrico, amarillo verdoso, con pedicelo subapical de 0.15 mm de longitud máxima (Maranhão & Maranhão, 2013). El ciclo de vida de *B. tabaci* normalmente dura 21 días como se puede observar en la Figura 1, los estadios de huevo hasta adulto. Este ciclo de vida es común en la clase insecta como lo distingue su taxonomía en la tabla V.

2.4.3 Importancia económica:

La importancia económica de esta plaga se debe a su alta y rápida capacidad reproductiva en condiciones climáticas cálidas, a la gran variedad de plantas hospederas que posee, tanto cultivadas como silvestres, así como a su alta eficiencia en la transmisión de enfermedades de origen viral. Estos factores inducen la generación de poblaciones altas que causan daños que afectan el normal desarrollo de las plantas, así como la calidad del producto a cosechar. Su capacidad para desarrollar resistencia dificulta su control, mediante el uso exclusivo de insecticidas químicos, siendo necesario el establecimiento de un enfoque de manejo integrado en el que se incluyen los enemigos naturales y otras medidas de control disponibles.

2.4.4 Daños que causa:

La mosca blanca (*B. tabaci*) constituye un serio problema debido a los daños directos e indirectos que ocasiona. Los de tipo directo son realizados por ninfas y adultos que al inyectar saliva tóxica y al succionar la savia de las plantas las debilitan y pueden, en casos extremos, provocar desecamiento y caída de las hojas afectadas. Los de tipo indirecto, se deben a la secreción de melado que favorece el desarrollo de hongos *Capnodium sp.* conocidos comúnmente como fumagina, que produce asfixia de la planta y disminución de la función fotosintética. Además, la mosca blanca actúa como transmisora de enfermedades víricas y bacterianas (Maza et al., 2013).

El uso irracional de productos químicos sintéticos para su control ha traído diversas consecuencias, como: acumulación de residuos químicos en alimentos, desequilibrio ecológico por la eliminación de organismos benéficos, contaminación del ambiente, intoxicación de operadores y desarrollo de resistencia a productos químicos (Rodgers, 1993). Esta problemática ha desencadenado estrategias alternativas de control de esta plaga; una de ellas y, la cual se vislumbra como más viable, es el control biológico, en el cual están los HE.

2.5 Cultivo de ají (*Capsicum anunn*)

El ají (*Capsicum annum* L.), pertenece a la familia de las solanáceas (*Tabla VI*), es una planta herbácea, de ciclo anual que varía entre los 65 a 110 días dependiendo la variedad, alcanza los 0.5 metros de altura en campo abierto y hasta dos metros gran parte de los híbridos en condiciones protegida. En la época precolombina el ají se difundió por la mayor parte del continente americano y durante los siglos XV y XVI los colonizadores españoles y portugueses la llevaron a Europa, África y Asia (Araúz & Luquéz, 2020).

En nuestro país la principal zona de producción de ají es el distrito de Renacimiento, Chiriquí las zonas donde más se cultiva son: Caisán, Alto Quiel, Cañas Gordas, Nueva Deli, Monte Lirio, Santa Clara y Caña Blanca teniendo una densidad por hectárea de 15 mil matas. Las principales variedades sembradas: ají Natali y Pico de Loro, el costo

actual en el mercado del ají de primera esta por el orden de los 1.98 balboas el kilogramo, mientras que el de segunda se comercializa a 1.32 balboas el kilogramo y el de tercera a 0.66 centésimos el kilogramo (Vásquez, 2021).

Tabla VII. Taxonomía de *Capsicum annum*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Genero:	<i>Capsicum</i>
Especie:	<i>Annum</i>

Fuente: Godoy (2018).

Según Haya (2018), la morfología de la planta de pimiento es la siguiente:

- 1) Planta: herbácea perenne con ciclo de cultivo anual de porte variable entre los 0.5 m, en determinadas variedades de cultivo al aire libre y más de 2 m. en gran parte de los híbridos cultivados en invernadero.
- 2) Sistema radicular: pivotante y profundo, dependiendo de la profundidad y textura del suelo, con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 0.5 m y 1 m.
- 3) Tallo principal: crecimiento limitado y erecto. A partir de cierta altura emite 2 o 3 ramificaciones dependiendo de la variedad y continúa ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo.
- 4) Hojas: entera, lampiña y lanceolada, con un ápice muy pronunciado y un peciolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto) y de color verde más o menos intenso dependiendo de la variedad. El nervio principal parte de la base de la hoja, como una prolongación del peciolo, del mismo modo que las nerviaciones secundarias que son 6 pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto.

2.5.1. Principales plagas en el cultivo de ají

Certis (2018), manifiesta las principales plagas en ají se produce en la época seca y tenemos las siguientes plagas con mayor frecuencia dentro del cultivo: mosca blanca, araña roja, pulgones, trips, entre otros que atacan con mayor incidencia a la familia de la solanáceas.

2.6 HE como endófitos

Varios HE poseen una acción como organismos endógenos de las plantas. Esto quiere decir colonizan los tejidos internos sin causar aparente daño o síntoma a su huésped. Por ello, su eficacia podría durar mucho más que los no endófitos puesto que sobreviven por más tiempo durante todo el ciclo del cultivo, dando un valor agregado ya que actúan como promotores del crecimiento. *B. bassiana* es uno de los entomopatógenos más estudiados alrededor del mundo y su acción ha sido comprobado en diferentes cultivos (Pacheco, 2021).

La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas. En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la patogenicidad del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos (Sánchez et al., 2013).

Los endófitos promueven el desarrollo de diversos mecanismos de defensa contra plagas de insectos, tienen efecto en el crecimiento de las plantas, son antagonistas de fitopatógenos y pueden colonizar la rizosfera. Estos microorganismos tienen la capacidad para colonizar una amplia variedad de especies de plantas en diferentes familias tanto de manera natural como artificial (Méndez, 2019).

Se ha reportado, en muchas especies vegetales, una microbiota asociada que permanece en los tejidos internos de las plantas hospederas, tanto en raíces, tallos, hojas y hasta frutos, (Lozano & Laberry, 1993). Los hongos endófitos tienen un gran potencial como agentes de control microbiano de plagas, pues se ha demostrado su actividad sobre todos los órdenes de insectos fitófagos, por inoculación o inundación, aplicación a la planta o al suelo, e incluso por medio de dispositivos de atracción e infección (González, 2019).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Aislamientos de cepas de hongos entomopatógenos

- Platos Petri
- Vaso químico
- Papel toalla
- Cinta adhesiva
- Marcadores
- Mechero
- Estereoscopio
- Autoclave
- Refrigeradora
- Bolígrafos
- Pipetas y puntas
- Balanzas
- Parafilm
- Agua esterilizada
- Medios de cultivos
- Tween 80
- Tubos de ensayo
- Microscopios
- Cubreobjetos y portaobjetos
- Gotero
- Tubo Falcon
- Eppendorf (viales)
- Aspersor
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora

Dieta de *Galleria mellonella*

- Leche de ternera
- Envase de vidrio
- Miel de abeja
- Harina de trigo
- Salvado de trigo

Ambiente controlado, planta huésped, cría de insecto plaga

- Estructura de PVC (tubos, uniones, codos, pegamento PVC)
- Malla de sarán
- Zunchos
- Tubo metálico
- Carriolas
- Mallas contra áfidos
- Bolsas negras
- Sustrato (tierra negra)
- Semillas de ají
- Sistema de riego por goteo
- Mosca blanca (cría de insecto plaga)

3.2 Metodología

Para la obtención de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se solicitó al IDIAP de Divisa dos aislados puros para dar inicio en el laboratorio de la FCA la multiplicación de los HE en el medio de cultivo papa agar dextrosa (PDA)

- **Preservación de los aislados:**

Para la preservación se utilizó agua destilada estéril autoclavada, mediante el método modificado de (Bueno & Gallardo, 1998), que consiste en cortar porciones de 1 cm² de un cultivo esporulado y colocarlos dentro de un tubo Falcon de 15 mL de polipropileno esterilizado, con 10 mL de agua destilada estéril como se observa en la figura 2. Cada

tubo se conservó en un refrigerador a 4°C y se realizó tres repeticiones por aislado, con el objetivo de preservar mayor material fúngico para futuras investigaciones y aplicaciones en la agricultura nacional.

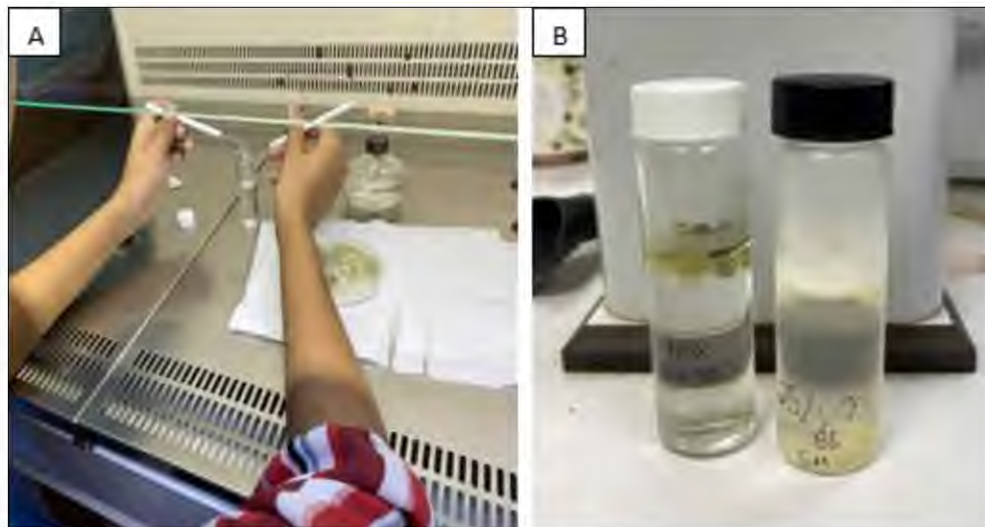


Figura 2. (A) extracción de medio de cultivo para su conservación; (B) HE en conservación.

- **Características macroscópicas:**

Basándose en el cultivo monospórico, los hongos aislados se cultivaron en el medio de cultivo PDA con antibiótico (cloranfenicol a 0.05 g/L), para inhibir el crecimiento de bacterias. Seguidamente se incubó a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en completa oscuridad. Por cada aislado se colocaron cuatro réplicas y se evaluó a los 10 días después de sembrado (dds), y la caracterización macroscópica de las especies fue en base a los criterios propuestos por Mier et al. (2002), donde incluye color de la colonia en el anverso y reverso, aspecto, consistencia, superficie, velocidad de crecimiento y tamaño.

- **Cría de *Galleria Mellonella*:**

La cría de *G. mellonella* se realizó en el laboratorio de grupo de investigación en protección vegetal (GIPROBEC) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá sede Chiriquí, las larvas fueron donadas por estudiantes de la universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI) con el fin de obtener un pie de cría para poder multiplicar las larvas mediante una dieta artificial bajo una temperatura (20

a 25°C) y una humedad relativa de 80%. Para la cría de este insecto se utilizó una dieta artificial, cuyos ingredientes son: 400 g de salvado de trigo, 120 g de harina de trigo, 160g de leche de ternero y 300 ml de miel por cada 680 g de dieta. Esta mezcla se colocó en una bandeja multiusos de 21 x 18 x 10cm.

- **Fase patogénica:**

La virulencia fúngica por cepa se probó en diez larvas de sexto estadio de *Galleria mellonella*, estas fueron sumergidas en una suspensión de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹ durante 20 segundos y luego se colocó en platos Petri con dieta a 25°C. La mortalidad larvaria se registró diariamente durante 10 días y se analizó estadísticamente con ANOVA y los rangos de supervivencia por medio de la prueba Kaplan-Meier. Las larvas muertas se desinfectaron inmediatamente con hipoclorito de sodio al 1%, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron en platos Petri con papel filtro a temperatura ambiente, con el fin de observar si hubiese crecimiento fúngico. Se realizaron 3 repeticiones por cepa las cuales se muestran en la Figura 3.

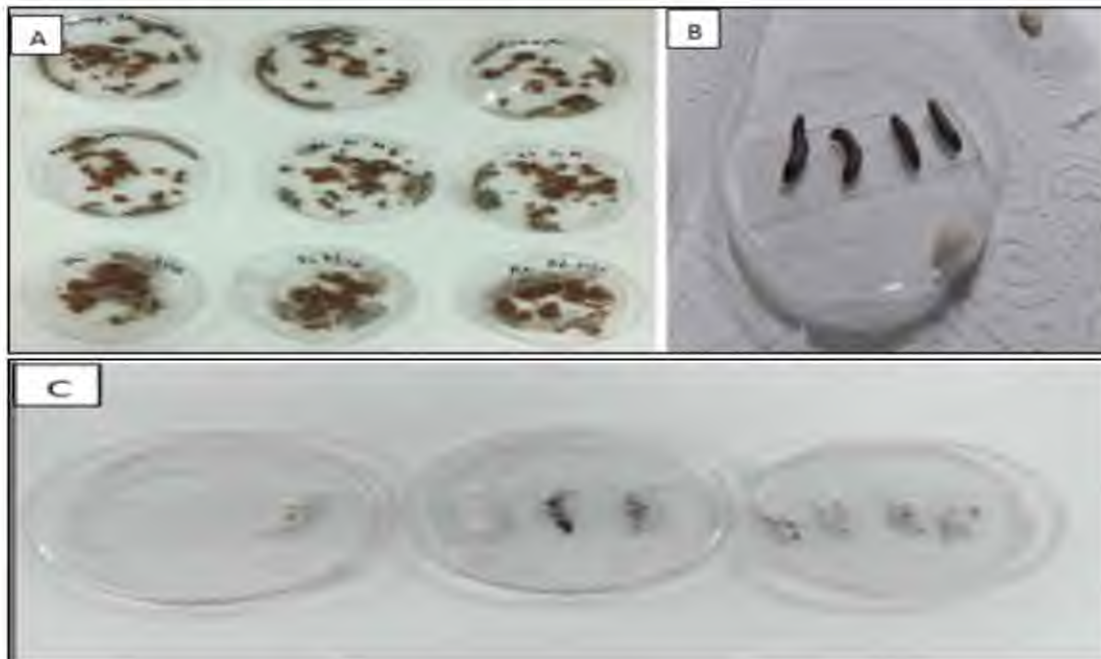


Figura 3. (A) *G. mellonella* sumergidas en una suspensión 1×10^8 Conidios/ mL⁻¹; (B) Cámara húmeda con larvas muertas; (C) Crecimiento fúngico de *B. bassiana*.

Construcción de la estructura para un ambiente controlado:

Se realizó la construcción del ambiente controlado a base de materiales de PVC (policloruro de vinilo) creando una estructura apta para que quepan las bolsas negras en las cuales se distribuyó en hileras teniendo una separación aproximada de 60 cm entre cada tratamiento como se puede determinar en la Figura 4, luego se rellenaron las bolsas con tierra negra a la cual se sometió a esterilización mediante el uso de agua caliente, como sustrato para sembrar las semillas de ají para que empezara la germinación de las semillas (10-12 días).



Figura 4. (A) Vista externa del invernadero; (B) Vista interna del invernadero.

- **Fase endófitica (Inoculación fúngica a las plantas de ají)**

Se sembró 15 plántones de ají en sus respectivas bolsas de 10 lb y se inoculó a los 40 días cuando presentaron de 3 a 4 hojas verdaderas, pulverizando con una suspensión 1×10^8 conidios/ mL^{-1} de suspensión de hongos ambas cepas (2 mL por planta), cubriendo la base del tallo con papel de aluminio procurando que no se escurra hacia la tierra. Se procedió a tomar muestras al azar a las 24 horas de haber aplicado el HE y luego a los 48, 72, 96 y 120 horas, éstas se lavaron con agua, luego se dividió en hojas, tallo y raíz, y estas partes se desinfectaron sumergiéndolas en etanol al 70% durante 2 minutos, 5 minutos en NaOCl al 5%, seguidas de dos enjuagues en agua estéril durante 2 minutos (Figura 5). Las muestras se secaron sobre papel de filtro en cámaras de flujo de aire. Se colocaron 10 fragmentos de hojas de aproximadamente

1 cm en placas Petri en medio de cultivo. Las placas se mantuvieron en una incubadora a 25 °C durante 12 días. El porcentaje de colonización se determinó con base en el número de estos fragmentos que mostraron crecimiento fúngico. Lo mismo se evaluó en tallo y raíz. Las plantas de control se asperjaron con Tween 80 al 0,1% (p/v) en agua estéril.

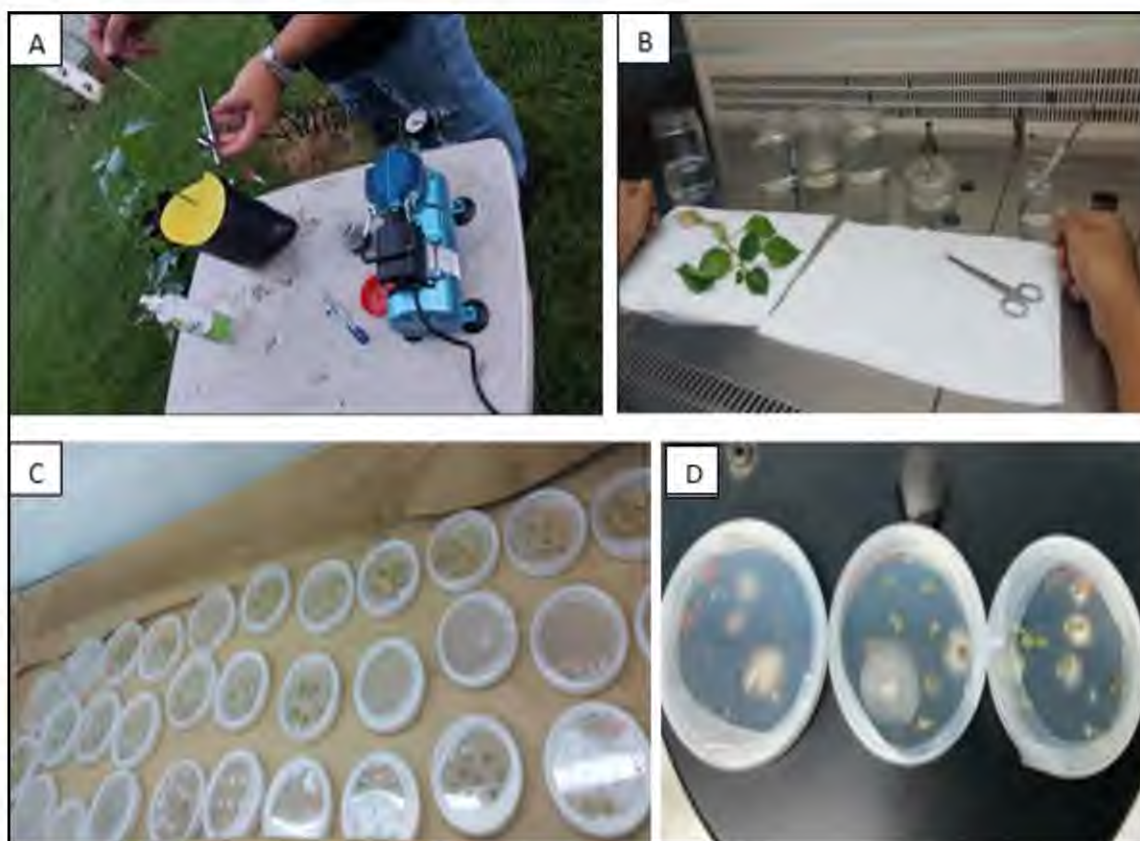


Figura 5. (A) Aspersión de plántones con suspensión de cepas de HE; (B) Desinfección de plántones en cámara de flujo laminar; (C) Fragmentos de hoja, tallo, y raíz en medio PDA (D) crecimiento fúngico *B. bassiana* en fragmentos.

- **Cría de insectos plaga (*Bemisia tabaci*)**

Para la cría de mosca blanca se realizó una siembra de ají separada de donde se encuentran los plántones que se utilizaron en la fase experimental, para ello se sembraron 25 plántones trampa, que realizaron la función para que la mosca blanca se hospede y al cabo de 19-22 días ya culminado su ciclo contábamos con una cría homogénea estando presente todos sus estadios, cabe destacar que esta siembra se realizó al aire libre para que la mosca blanca colonizara al cultivo.

- **Trampas clip**

Para la elaboración de las trampas clip se utilizó pequeños recipientes de plástico, los cuales se les perforaron el centro para ingresar la mosca blanca con la ayuda de una pipeta. Para sujetarlos a la hoja se utilizó cinta adhesiva, sujeto al tallo de la planta para no ejercer peso sobre la hoja, los cuales sujetaron a la parte inferior y superior de las jaulas clip (Figura 6).



Figura 6. Trampas clips.

- **Prueba de potencial biocontrolador de cepas de hongos entomopatógenos en *B. tabaci* en el cultivo de ají:**

Para realizar esta prueba se utilizó plantones de ají tutorados de 45 días en bolsas negras ubicados en el ambiente controlado. El experimento fue establecido mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones por tratamiento, realizando ensayos con las dos cepas de HE. Para aplicarlo teniendo como unidad experimental una planta de ají y la unidad de muestreo consistió en una hoja sana. Se seleccionó una hoja sana de cada plantón para colocar las jaulas clip, las cuales se le introdujo 25 moscas blancas provenientes de la cría al aire libre para garantizar la ovoposición y ubicación de los huevos. Al transcurrir los dos días se retiraron los

adultos registrando el número de huevos y a partir de los cultivos puros de las dos cepas de HE se prepararon concentraciones de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹. La inoculación utilizando 1 mL se realizó cuando las ninfas se encontraron en el segundo instar por medio del método de aspersión. Las hojas se revisaron para asegurar la presencia de huevos y se observaron diariamente con la ayuda de un microscopio digital (Figura 7).

Después de realizada la inoculación se observó cada 48 horas para registrar variables a evaluar como: el número de ninfas muertas, ninfas vivas o cualquier otro evento asociado al efecto de los hongos sobre la mosca blanca.



Figura 7. (A) Tutorío en plantones ají; (B) aspersión en plantones con cepas de HE; (C) Vista con microscopio digital de ninfas con crecimiento fúngico.

Análisis estadístico:

Para la evaluación del potencial patogénico de las cepas *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre las larvas de *G. mellonella* se utilizó el análisis estadístico Kaplan-Meier para determinar la supervivencia al ser expuestas a la suspensión con las cepas de HE.

En la prueba endófito y la fase biocontroladora para obtener los resultados y el grado de significancia fue demostrado mediante el método estadístico de chi cuadrado con el uso del programa GraphPad.

Resultados y discusión

4. Resultados

4.1 Caracterización morfológica de los aislados nativos *Beauveria bassiana* (IDIAP Bb 8-1) y *Metarhizium anisopliae* (IDIAP Mt2)

Caracterización de *B. bassiana*:

La evaluación para caracterizar la cepa de *B. bassiana* se realizó a los 10 días logrando alcanzar un promedio de 18 mm de diámetro a una temperatura promedio de 25°C, presentando en el anverso de la colonia un crecimiento lento, en muchos casos circular de aspecto algodonoso con una coloración blanca que con el tiempo se torna de un aspecto crema polvoriento, teniendo una consistencia blanda y una superficie semi-elevada. Mientras que en el reverso de la colonia presenta una coloración amarillenta.

La cepa presenta conidios globosos, redondeados, hialinos, de un tamaño de 2.5 μm - 3 μm , y conidióforos sencillos formando racimos irregulares agrupados, por células conidiógenas con forma de cuello de botella con una base en forma globosa, presentando raquis en forma de zigzag como se muestra en la Figura 8.

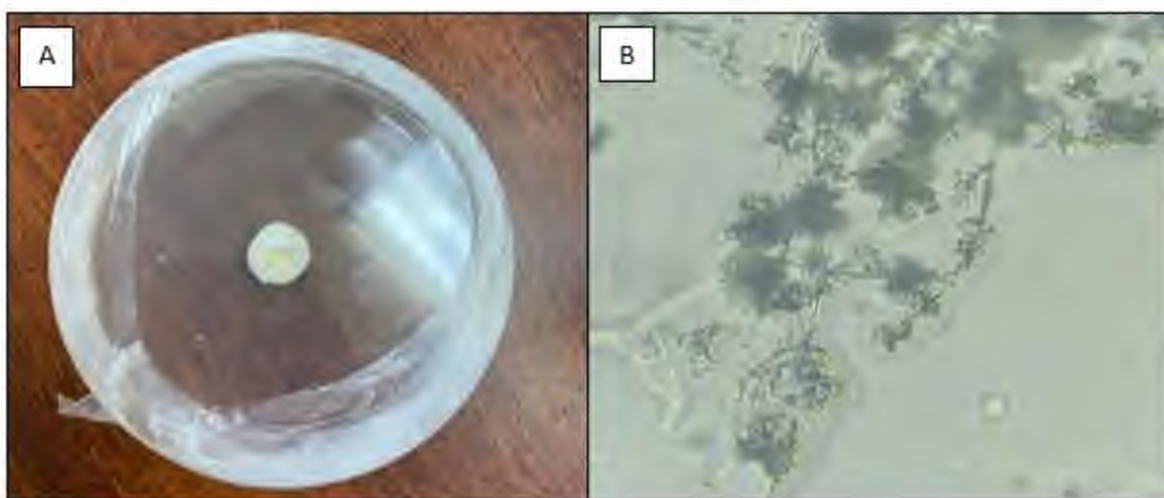


Figura 8. (A) Colonia monospórica de *B. bassiana* multiplicada sobre un plato Petri con medio de cultivo (PDA); (B) vista microscópica de la cepa.

Caracterización de *Metarhizium Anisopliae*:

La cepa *M. anisopliae* a los 10 días presenta un crecimiento relativamente rápido de forma circular con colonias de 25 mm de diámetro a una temperatura de 25°C, su coloración es blanca al inicio con aspecto algodonoso y se torna de un color verde

oliva de aspecto polvoriento y superficie plana. En el reverso de la colonia presenta una coloración marrón.

Esta especie posee conidios alargados, en forma de cilíndricos, lisos, sus extremos son redondeados y su coloración va de subhialinos a verdes, se encuentran agrupados en cadenas de forma paralela. Los conidios tienen un tamaño de $5,60-8,0 \times 2,0-2,80 \mu\text{m}$ como se aprecia en la Figura 9.

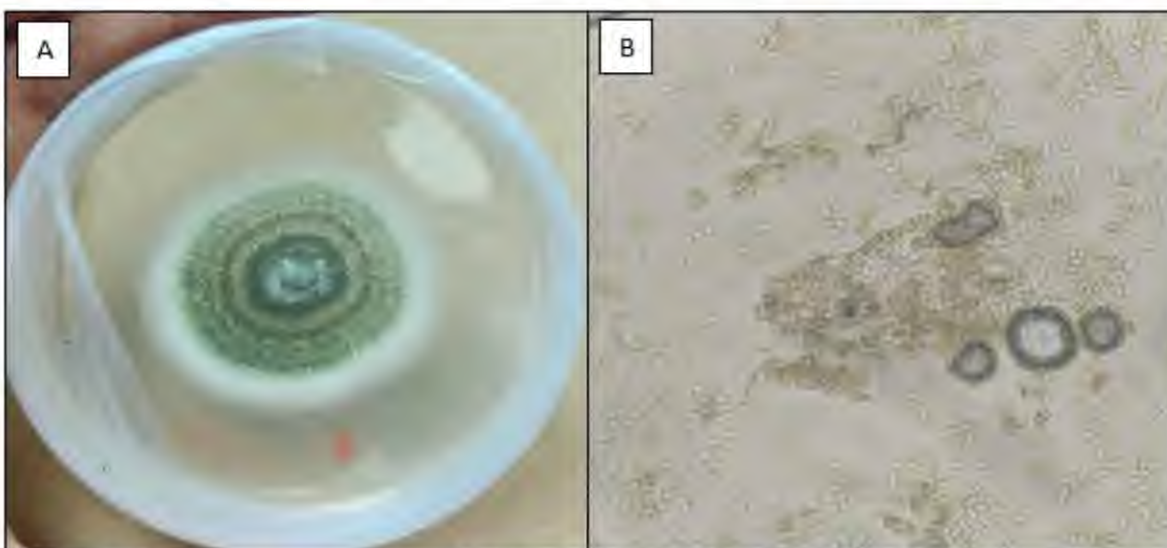


Figura 9. (A) Colonia monospórica de *M. anisopliae* multiplicada sobre un plato Petri con medio de cultivo (PDA); (B) vista microscópica de la cepa.

4.2 Patogenicidad de cepas monospóricas de *B. bassiana* (IDIAP Bb 8-1) y *M. anisopliae* (IDIAP Mt2) sobre larvas de *G. Mellonella* en condiciones de laboratorio.

Se utilizó el estimador de supervivencia no paramétrico Kaplan-Meier, mediante una gráfica como se observa en la Figura 10 para calcular la variable de mortalidad, en donde se determinó que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$), entre los dos aislados, en una concentración de 1×10^8 conidios/ mL^{-1} , con este tratamiento se observó que la mayor efectividad de mortalidad se obtuvo con la cepa de *B. bassiana* cómo se puede mostrar en la tabla V. Otro aspecto evaluado, que se observó fue que ambas cepas presentaron mortalidad a partir del cuarto día en adelante, en cuanto al testigo no presento números de muertes.

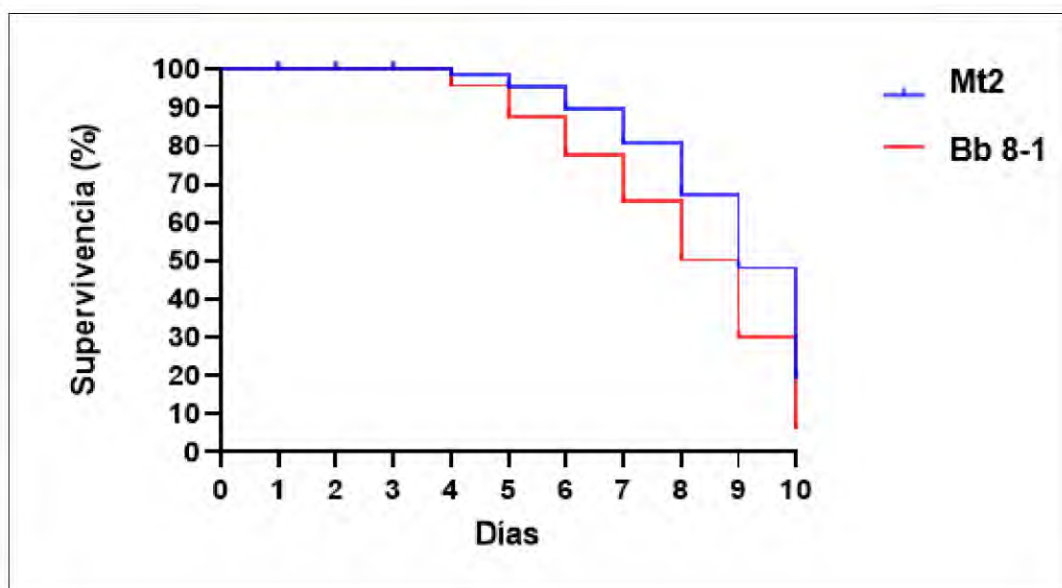


Figura 10. Porcentaje de supervivencia de larvas de *G. mellonella* inmersas en suspensiones de cepas de HE a una concentración de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹ de los aislados IDIAP Bb 8-1 y IDIAP Mt2.

Tabla VIII. Porcentaje de mortalidad (promedio \pm SE) %, en una concentración de 1×10^8 conidios/mL⁻¹.

CEPAS	Porcentaje mortalidad	Porcentaje con crecimiento fúngico	Porcentaje de mortalidad por otras causas
IDIAP <i>Bb</i> 8-1	80 \pm 3.33*a	70 \pm 3.33*a	10 \pm 1.66*a
IDIAP <i>Mt2</i>	56.6 \pm 2.69*b	50 \pm 3.05*b	6.67 \pm 0.37*a

*Letras diferentes indican que se encontraron diferencias significativas y letras iguales dentro de la columna muestran que no existen diferencias significativas.

4.3 Evaluación de las cepas *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para determinar su potencial endófito en hojas, tallo y raíz de ají.

Al evaluar los fragmentos colonizados de ambas cepas se observó que al cuarto día en adelante mostraron crecimiento de micelio. Según la prueba Chi-cuadrado no existe diferencias significativas para el caso de hoja y tallo en cuanto a porcentajes y tiempo de colonización, a excepción de la raíz que si mostro diferencias significativas entre las cepas ($\chi^2=10.39$, $df=4$, $P<0.0344$) como se puede observar en la Figura 11.

El mayor porcentaje de colonización en hoja se obtuvo a las 72 horas (90%) en el caso de *B. bassiana* y en *M. anisopliae* a las 96 horas (86%). En cuanto al tallo la

colonización fue levemente menor, el mayor porcentaje de crecimiento se obtuvo a las 72 horas (74.7%) con *B. bassiana*. Al igual que *M. anisopliae*. a las 96 horas (76.7%). Se obtuvo diferencia significativa en los fragmentos de raíz mostrando el mayor porcentaje la cepa de *B. bassiana*. a las 120 horas (57%) a diferencia de *M. anisopliae*. que presento su mayor colonización a las 120 horas (30 %).

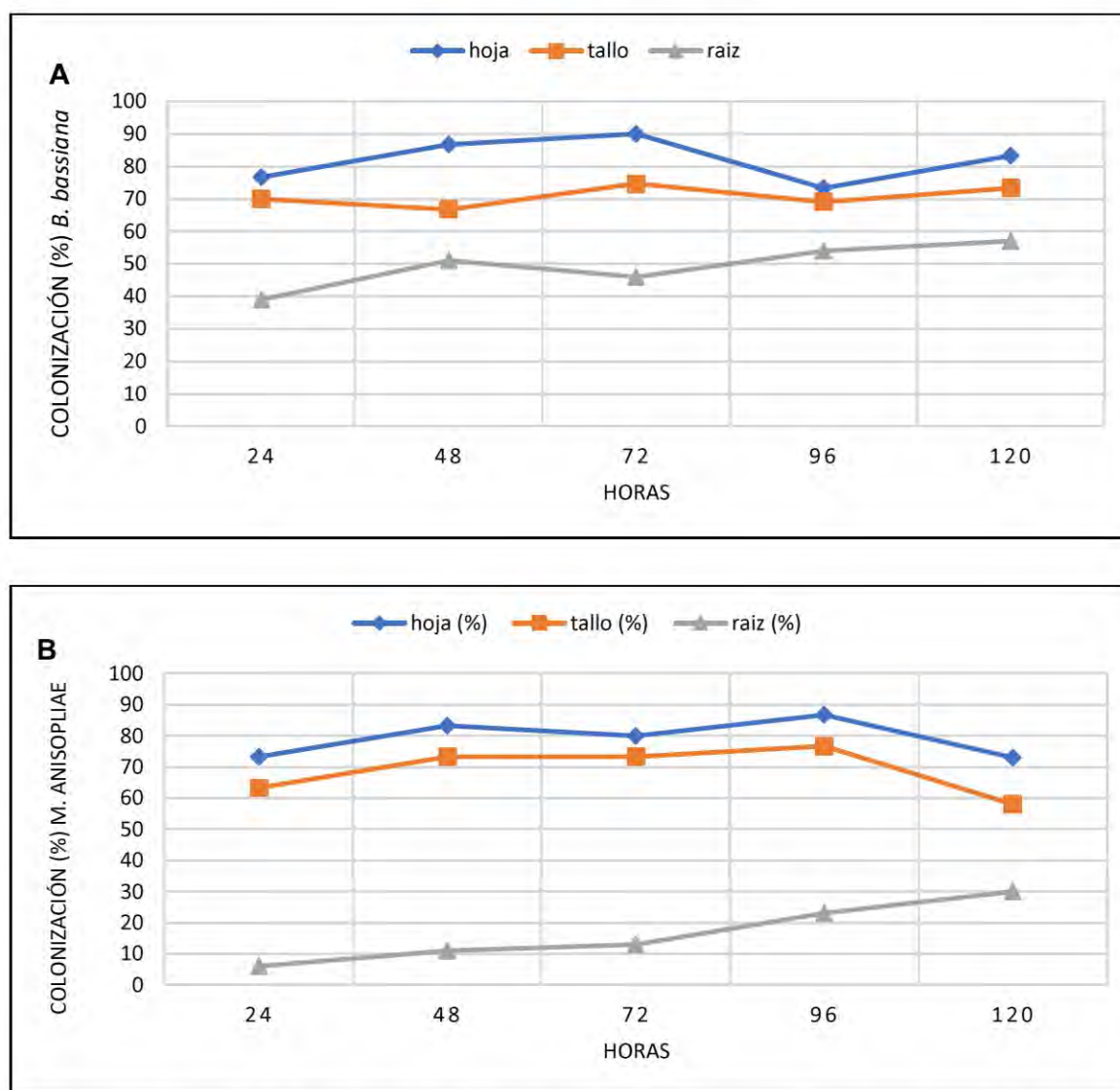


Figura 11. Porcentaje de colonización de las evaluaciones realizadas después de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs. de la inoculación, en diferentes partes de los plantones de ají (hoja, tallo y raíz), asperjadas con una suspensión de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹ por cada cepa. (A) *B. bassiana* (B) *M. anisopliae*.

4.4 Capacidad biocontroladora de las cepas *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca blanca en el cultivo de ají en ambiente semi-controlado.

Tabla IX. Porcentajes mortalidad (*promedio* \pm *SE*) de ninfas de segundo estadio mediante el método de aspersión con cepas de HE a una concentración de 1×10^8 conidios/ mL⁻¹.

CEPAS	Porcentaje de mortalidad	Porcentaje de ninfas muertas con crecimiento de micelio	Porcentaje de ninfas muertas sin crecimiento de micelio
IDIAP <i>Bb</i> 8-1	30.47 \pm 2.39*a	21.4 \pm 1.24*a	11.9 \pm 1.44*a
IDIAP <i>Mt</i> 2	16.73 \pm 2.80*a	9.57 \pm 1.43*a	7.16 \pm 1.41*a

*Letras iguales dentro de la columna muestran que no existen diferencias significativas.

Al comparar ambos porcentajes de mortalidad de ninfas, según la prueba Chi-cuadrado muestra que no hay diferencias significativas (P- 0.1454), teniendo en cuenta la media de los tratamientos con las dos cepas de HE asperjados, para el caso de *B. bassiana* presento una media de 30.47%, mientras que con *M. anisopliae* presento un 16.73%, ambos resultados nos indican una baja mortalidad y control en el segundo estadio ninfal, bajo condiciones semicontroladas.

En cuanto a las evaluaciones realizadas para determinar el crecimiento micelial en las ninfas muertas se logra determinar mediante la prueba Chi-cuadrado que no hay diferencias significativas (P-0.4229) al comparar ambas cepas debido que para *B. bassiana* tenemos un crecimiento de micelio de un 21.4% y en *M. anisopliae* solamente un 9.57%, teniendo en cuenta la mortalidad promedio sin crecimiento fúngico con el uso de *B. bassiana*. alcanzando un 11.9% y con *M. anisopliae* 7.2% de ninfas muertas no presentando diferencias significativas. Siendo evaluadas en ambas cepas mediante tres repeticiones como se puede observar en la tabla VI.

4.5 Discusión

La caracterización morfológica de *B. bassiana* demostró que tiene un crecimiento lento de aspecto algodonoso de coloración blanca en el anverso y presentando una coloración amarillenta, existiendo concordancia con los estudios realizados por Castillo (2012) quien evaluó 10 aislamientos de *B. bassiana* en cultivo de PDA los cuales presentaron colonias de aspecto algodonosa al principio, que luego se tornaron pulverulentas con superficie semielevada y crecimiento moderado. Las colonias presentaron color blanco que durante el crecimiento micelial fue tomando un color amarillento, por la parte posterior de la caja de Petri. El tamaño de las esporas de los diez (10) aislamientos de *B. bassiana* osciló entre 2,6 x 2,2 μm , así mismo Echeverría (2006), en sus aislamientos de cultivos monospóricos de *B. bassiana* obtuvo una consistencia viscosa de color blanco, forma irregular y filamentosa, elevación plana y ligeramente abultada en los centros de los radios, con un margen ligeramente lobulado. La caracterización a nivel macroscópica de *M. anisopliae* tuvo un crecimiento inicial con una coloración blanca tornándose verde, de aspecto polvoriento, que a nivel microscópico se apreciaba conidios alargados en forma de cilindro con extremos redondeados, encontrándose agrupados teniendo concordancia con lo descrito por Valle-Ramírez et al. (2020), quienes describieron que las colonias del complejo de especies de *M. anisopliae* son inicialmente blancas, amarillas durante el desarrollo temprano de los conidios (típicamente de 4-7 días) y verdes con la maduración de los conidios (10-14 días). Driver et al. (2000) señalaron que los aislados de *M. anisopliae* generalmente tienen conidios cilíndricos verdes, de $5 \pm 7 \mu\text{m}$ de largo, que se forman en columnas de cadenas.

Al registrarse la mortalidad sobre *G. mellonella* al cuarto día post-inoculación con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se utilizó el estimador no paramétrico Kaplan-meier demostrando que se obtuvo diferencias significativas entre ambas cepas ($p < 0.0001$). Siendo similar al ensayo realizado por Cardona et al. (2015), mencionando la mortalidad ejercida por los diferentes tratamientos a través del tiempo, se puede observar que el tratamiento *B. bassiana* 2 g/L empezó a ocasionar mortalidad de larvas de *Diatraea saccharalis* al cuarto día después de la aplicación, incrementándose

progresivamente hasta alcanzar el 100% de la mortalidad a los 24 días después de la aplicación, mientras que, el tratamiento con *M. anisopliae* ocasiono un menor control, donde la mortalidad no superó el 16% sobre la plaga.

Beauveria bassiana demostró ser la cepa más predominante en nuestro ensayo porque presentó mayor mortalidad en las larvas de *G. mellonella* al cabo de 10 días, comparándolo con en el estudio realizado por Oreste et al. (2012), mostro similitud debido a que los aislamientos de *B. bassiana* tuvieron un impacto alto en *G. mellonella*. Mansur et al. (2003), informó que la tasa de mortalidad aumentó con la concentración de esporas de *B. bassiana*, y la tasa de mortalidad fue del 82 al 96% al final de 20 días en condiciones de laboratorio. Los datos del presente estudio fueron consistentes con lo analizado por Saleh et al. (2016), demostrando que la virulencia de *B. bassiana* fue efectiva en larvas de *G. mellonella* en los aislamientos fúngicos evaluados. Se informó que *B. bassiana* exhibió la mayor mortalidad de larvas en comparación con otros aislamientos fúngicos (Fathy et al., 2018). Resultados como estos evidencian la eficiencia de *B. bassiana* sobre larvas de lepidópteras en específico la de *G. mellonella*, resaltando la concentración 1×10^8 conidios/ mL⁻¹ para obtener resultados favorables para el control de insectos plagas.

Para el caso de *M. anisopliae* en el estudio realizado por Torres et al. (2014) evidencia mayor porcentaje de mortalidad en los resultados debido a una amplia variabilidad intraespecífica de cultivos monospóricos del hongo *M. anisopliae* en cuanto a su patogenicidad hacia larvas de *G. mellonella* demostrando la utilidad de cultivos monospóricos y su caracterización patogénica en la selección de aislamientos con características sobresalientes; así también, muestra el potencial del hongo estudiado para el desarrollo de bioinsecticidas contra *G. mellonella*. Con base en los resultados de Torres et al. (2014), los aislamientos de *M. anisopliae* más patogénicos hacia *G. mellonella* superaron el 80 % de mortalidad. En comparación con nuestros resultados se reflejan menores porcentajes suponiendo diferencias en los grados de virulencia de las cepas del hongo utilizado pudiéndose deber a las variaciones genéticas dadas por la especialización hacia un determinado hospedero y por la distribución geográfica de

donde se obtuvo la cepa, es decir que diversas adversidades climáticas alteran el desempeño a nivel genético dificultando expresar el potencial controlador al 100%.

Al evaluar las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en la hoja, tallo y raíz, presentó potencial endófito mostrando crecimiento micelial al cuarto día post-inoculación. Determinando la posibilidad que existe por parte de ambas cepas de expresar su potencial endófito. García et al. (2011), señala que al obtener reaislamientos del hongo en un punto distante de la inoculación, indica que el hongo es capaz de moverse dentro de la planta. Los autores argumentan que la penetración de los HE en los tejidos de las plantas se realiza a través de los estomas o por medio de la penetración directa mediante la actuación de la enzima MAD2 que permite la adhesión a la planta. Posteriormente, el movimiento se produce en los espacios intercelulares siguiendo la vía del apoplasto (Landa et al., 2013). En comparación con los insecticidas convencionales, el uso de los HE como endófitos tiene la ventaja de que son necesarias menores cantidades de inóculo, al encontrarse el insecto confinado en el interior. Además, la planta confiere protección al inóculo frente a factores abióticos y bióticos que limitarían su uso en condiciones de campo (Akello et al., 2008; Backman y Sikora, 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio demostraron una buena capacidad endófito. a pesar de que el ensayo no se realizó directo a la semilla. Quesada-Morgan et al. (2009) indican que muchos otros reportes resaltan las cualidades de la técnica de inoculación en semilla como la mejor técnica para introducir HE artificialmente en cultivos agrícolas, demostrando efectos antagónicos contra hongos fitopatógenos, así como una reducción del efecto causado por insectos plaga, ya sea por competencia de espacio y nutrientes o bien, por la inducción de respuestas de defensa de la planta. Resaltando como ventaja el tiempo que perdura las esporas del HE dentro del tejido de las plantas, así como mencionan Sánchez et al. (2018) puesto que han comprobado la presencia de *B. bassiana*, indicando que el método de aspersión a plántulas de trigo es el método más eficaz para la colonización en el follaje, reaislando de hojas una mayor cantidad del entomopatógeno a los 19 días después de la inoculación en comparación con el tratamiento a la semilla o la inoculación al suelo, estos autores encontraron que la presencia de esporas se mantiene hasta por 90 días en los tejidos de la planta.

Los fragmentos de hojas analizados con la prueba Chi-cuadrado evidencia que no se obtuvo diferencias significativas entre las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con un rango de porcentaje para el caso de *B. bassiana* con un 73.3 a 90% y para *M. anisopliae* 73 a 86.7%, de igual forma sucedió con los fragmentos de tallos ya que no se obtuvo diferencias significativas entre las cepas con un rango de porcentaje de 66.7 a 74.7% y de 58 a 76.7% respectivamente para cada cepa. Resultados como estos coinciden con lo descrito por Hernández (2019), que nos dice que las cepas de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* fueron las que presentaron una mayor colonización endófito en las plantas de maíz en los tejidos correspondientes a tallo y hoja. Por otra parte, las cepas de *M. anisopliae* presentaron los niveles de colonización más bajos en los dos ensayos realizados. Resultados como estos posiblemente se deben a que las cepas de HE utilizados, otorgan un buen desempeño como organismo endófito, además de que los plántones de ají utilizados eran bastantes jóvenes, facilitando el movimiento interno a través del xilema para brindar protección contra insectos plagas afirmando lo mencionado por Maura y Jaronski (2016) pues menciona que otro factor que se debe considerar el movimiento del hongo endófito ya que algunos son sistémicos y otros permanecen en el mismo lugar de la planta donde se inoculan.

El caso de *M. anisopliae* presentó un crecimiento más lento y menos prominente, para ello podemos asumir que la cepa de *M. anisopliae* tiene una actividad endófito menor, pero no por esto se descarta su potencial como organismo endófito. Como lo señalado por Corral et al. (2006), debido principalmente a la cepa usada, puesto que la virulencia de *M. anisopliae* varía entre cepas. Mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se ha determinado que cepas de esta especie provenientes de diferentes organismos poseen un elevado grado de polimorfismo, lo que sugiere una elevada variabilidad molecular intraespecífica. A estos casos en los cuales afecta la variabilidad molecular la única forma de poder ser más precisos al momento de determinar la cepa a utilizar es realizar más investigaciones enfocadas a este segmento para así tener ensayos más puntuales que respalden problemáticas como esta.

En comparación con los fragmentos de raíz según la prueba Chi-cuadrado demostró que si hubo diferencias significativas ($\chi^2=10.39$, $df=4$, $P<0.0344$) entre las cepas de *B. bassiana* con un rango de porcentaje de 23.3% a 34% y *M. anisopliae* con un rango de porcentaje 8% a 33.3%. *B. bassiana* presentó una mayor adaptación endófito en la zona radicular coincidiendo con lo reportado por Vianna (2018), donde la cepa de *B. bassiana* LPSc 1215 aislada de suelo en la Provincia de Jujuy, Argentina, fue la que mayor capacidad endofítica mostró en hoja, tallo e incluso en raíz en las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Los valores de colonización obtenidos para esta cepa disminuyeron con el tiempo, pero incluso a los 28 días post-inoculación los valores de recuperación permanecieron elevados especialmente en hojas ($42\% \pm 0,11$; $65,3\% \pm 0,1$ y $77,9 \pm 0,11$ en raíz tallo y hoja respectivamente). Cabe mencionar que la particularidad que se busca obtener al utilizar un método de inoculación es que la cepa tenga oportunidad de invadir todos los tejidos de la planta incluyendo el de las raíces en vista de que al ser inoculado vía foliar se limita la llegada del HE a la zona radicular, pero al obtener porcentajes de crecimiento fúngico en raíz sin haber realizado una aplicación dirigida al suelo resalta lo citado por Posada et al. (2007), porque reportaron que en plantas de café la aspersion foliar favorece la colonización en hojas y que la aplicación en suelo resulta en mayores colonizaciones de las raíces.

Sin embargo, la cepa de *M. anisopliae* utilizada para este ensayo fue menos eficiente a nivel radicular en comparación con *B. bassiana*, no coincidiendo con lo mencionado por Vianna (2018), la cepa LPSc1366 de *M. anisopliae* obtenida en campo en este estudio, fue la única cepa de la especie en demostrar capacidad endofítica, colonizó preferentemente las raíces aunque estos valores también disminuyeron con el transcurrir del tiempo para finalmente a los 28 días no registrarse dicha cepa como endófito. Distintas especies del género *Metarhizium* son consideradas vinculadas naturalmente a la rizósfera (Meyling et al. 2011).

Al evaluar la Capacidad biocontroladora por parte de las cepas de HE frente a las ninfas de *B. tabaci* en un ambiente semi-controlado obtuvimos resultados superiores con la cepa de *B. bassiana* coincidiendo con Ríos-Velasco et al. (2014), dado a que verificaron la patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con distintas

concentraciones de conidios para el control de ninfas de *B. tabaci* en *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de laboratorio. *B. bassiana* provocó mayor mortalidad en *B. tabaci* a una concentración de 6.1×10^7 conidios/ mL⁻¹ (100 %) y *M. anisopliae* con una concentración de $9,5 \times 10^7$ conidios/mL (87,9 %) durante 8 días. Tomando en cuenta que en nuestro ensayo utilizamos el cultivo de ají con una concentración de 1×10^8 conidios/mL⁻¹, coincidimos en que el porcentaje más alto de mortalidad se logró con *B. bassiana* a los 8 días. En nuestras condiciones no logramos obtener índices de mortalidad tan elevados y a su vez no se obtuvo diferencias significativas según la prueba Chi-cuadrado entre los dos aislados. Asumiendo que al realizar el ensayo se presentaron diversos factores que alteraban los resultados, tales como: la temperatura y la humedad relativa, sin embargo, otros estudios han demostrado que las altas temperaturas pueden jugar un papel más importante que la humedad como factor limitante en el desarrollo de la micosis (Inglis et al., 1997a,b,c), lo cual reviste interés especial en regiones de clima seco y caluroso donde las plagas de *B. tabaci* alcanzan relevancia principal.

Al tener presentes temperaturas elevadas la viabilidad de las esporas disminuye drásticamente, adjunto a eso la condensación en el frasco (trampas clips) a causa de la alta humedad relativa dentro del invernadero ocasionaba una muerte más rápida para las moscas blancas alterando los datos e incrementando la mortalidad de ninfas sin crecimiento micelial. Teniendo en cuenta que nuestro estudio utilizamos ninfas de segundo instar basándonos en lo mencionado por Morales y Cardona (1996) determinaron que a los primeros estados de desarrollo de *T. vaporariorum* y *B. tabaci* como los más susceptibles a diferentes especies de HE, siendo los huevos próximos por eclosionar el estado ideal para hacer la aplicación por su alta tasa de mortalidad, determinada por la baja emergencia de adultos. Sin embargo, se presentaron razones ya antes mencionadas que limitan el estudio a nivel de campo puesto que se presentan situaciones climáticas reales que afectan la interpretación de los datos, pero no se descartan, puesto que es un inicio para las futuras investigaciones. Consecuentemente, a esto podemos resaltar lo señalado en un estudio realizado por Fransen et al. (1987) con varios aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el cual la aplicación de las cepas fue en estadios de huevo, en donde no se obtuvo diferencias

en la mortalidad de huevos, al comparar entre los huevos expuestos a los hongos contra el testigo. Sin embargo, en el mismo estudio, se encontró que las ninfas provenientes de huevos tratados con hongos mostraron señales de infección. Esto podría indicar que los primeros estadios ninfales pueden infectarse con los conidios al salir del huevo, aunque el huevo no sea directamente afectado. Esto es relevante debido a que podría indicar un efecto residual importante, al infectarse cuando entre en contacto con las esporas que permanezcan sobre las hojas.

Al tratar con moscas blancas debido a las características morfológicas que presenta esta especie secreta una sustancia cerosa de color blanco, que dificulta identificar el crecimiento de micelio del hongo, que para ello utilizamos un microscopio digital para la obtención de los datos, siendo está una limitante para el estudio por tratarse con una especie con reducido tamaño. Sin embargo, para *M. anisopliae* por presentar capacidad infectiva menor, en invernadero ha demostrado un control inferior que el de *B. bassiana*. Estos datos no coinciden con el estudio realizado por Herrera et al. (1999), puesto que reporta que los mejores se obtuvieron con cinco aislados de *M. anisopliae* que mostraron alta virulencia, alcanzando niveles de mortalidad de hasta 97%. Al igual que, Batta (2003) utilizando conidios de *M. anisopliae*, formuladas en aceite de coco/soja y no formuladas, a una concentración de 5×10^6 conidios/ mL⁻¹, obtuvieron 100% de mortalidad de ninfas de *B. tabaci* con los conidios formuladas y 66,7% con los conidios no formuladas. Afirmando lo mencionado por Malsam et al. (2002), encontraron que los conidios de *M. anisopliae* se pueden distribuir de manera más uniforme en formulaciones de aceite, cubriendo de forma más regular la cutícula de ninfas de *Trialeurodes vaporariorum*, pero, sin la adición de aceite a la suspensión de esporas, los conidios se distribuyen de forma muy irregular en el tegumento de las moscas blancas. “alrededor del 30% de las ninfas y huevos fueron totalmente cubiertos con masas de conidios y otras ninfas quedaron casi libres de esporas”. Tomando como referencia estos estudios podemos inferir que al utilizar como diluyente medios acuosos disminuye drásticamente la viabilidad del hongo debido a que al adherirse al insecto plaga, en nuestro caso ninfas de *B. tabaci* presenta mayor dificultad en comparación con el uso de un medio aceitoso. Al igual que en estudio realizado por Resquín-Romero (2016), no coincidiendo con los datos obtenidos al evaluar las cepas

de *B. bassiana* y *M. brunneum* en hojas de plantas de melón, se observó una mortalidad adicional en ninfas de mosca blanca *B. tabaci*, que varió del 53,4% en individuos tratados directamente con los entomopatógenos a un 96% en ninfas alimentadas con plantas inoculadas con los endófitos. En los tratamientos con *M. brunneum* se observó que el 43% de las ninfas melanizadas presentó dextruxina A, un metabolito secundario que posiblemente es responsable de la mortalidad de los insectos. En cambio, estos resultados no concuerdan de los obtenidos en nuestra investigación y mediante estudios se puede inferir a que la patogenicidad de cada cepa está influenciada por componentes de origen genético, debido a que no todas las cepas van a demostrar el mismo potencial controlador por su variabilidad genética.

5. CONCLUSIONES

- Se multiplicó las cepas puras de hongos monosporicos proporcionados por el IDIAP lográndose obtener con éxito un crecimiento radial semejante y con alta densidad de esporas fúngicas para ambos aislados *B. bassiana* y *M. anisopliae* con el uso del medio de cultivo PDA obteniendo un crecimiento completado en su totalidad al cabo de 15 días.
- Ambos aislados fúngicos fueron patogénicos para larvas del quinto instar de *Galleria mellonella*, teniendo mayor mortalidad con *B. bassiana* (IDIAP Bb 8-1) con un 70% mientras que *M. anisopliae* (IDIAP Mt2) con un 50%.
- Ambas cepas inoculadas en el cultivo de ají mediante la técnica de aspersión presentaron actividad endófitica en los fragmentos de hoja, tallo y raíz examinados, siendo *B. bassiana* la cepa con mayor porcentaje de colonización a nivel radicular.
- La capacidad biocontroladora de las cepas de HE sobre el segundo instar de ninfas de *B. tabaci* se definió con un control erradicante con crecimiento visual de esporulación en mayor parte con la cepa de *B. bassiana* teniendo en cuenta que a nivel de campo no se alcanzaron a obtener porcentajes altos por las condiciones del medio circundante.
- Se caracterizaron dos cepas de HE, con el potencial para ser cultivados y utilizadas en investigaciones como biocontroladores.

6. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones con el uso de HE específicamente *B. bassiana* y *M. anisopliae* se recomienda seleccionar un insecto plaga con una etapa de desarrollo más marcada entre estadios, para facilitar la obtención de datos en la visualización del crecimiento micelial en un punto donde la micosis sea más prominente en cuerpo del insecto a controlar.

Cuando se trate la multiplicación de cepas puras de HE se debe recurrir a utilizar distintos medios de cultivos para decidir con cual es más promisorio para la multiplicación ya que al manipular estas cepas, el medio en el cual se multiplicarán es clave para elaboración de estos ensayos porque no en todos los medios se logra expresar el crecimiento por parte de una cepa de HE.

A nivel comercial o de campo recomendamos el uso de adherentes-penetrantes que impulsen la actividad de control tanto endófito como de contacto para así crear un efecto más residual en la capa serosa de la hoja en el cultivo y que penetre mayor rapidez para la asimilación a través de los vasos vasculares y poder brindar un efecto preventivo.

Continuar con investigaciones enfocadas en el uso de biocontrol con cepas autóctonas de HE para evaluar el comportamiento frente a el insecto huésped de interés.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akello, J., Dubois, T., Coyne, D. & Kyamanywa, S., 2008. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 129, 157-165.
- Alves, S. (1986). Control microbiano de insectos. Manole, Sao Paulo, Br. 407
- Araúz, H. J. & Luquéz, K. S. (2020). Efecto de 4 tipos de sustratos y enraizadores sobre el crecimiento, desarrollo, dinámica de plagas y la producción del cultivo de chiltoma Nathalie (*Capsicum annum* L.) en ambiente protegido, El Plantel, 2018. Obtenido en línea: <https://repositorio.una.edu.ni/4181/1/tnf02a663.pdf>
- Badii, M. H. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*, (1). 82-89.
- Barra L., Parra K., Ortiz J. & Parra P. (2018). Hongos endófitos: innovadora alternativa de protección vegetal. Obtenido en línea: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67190/NR42370.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Batista, E. (2019). Mosca-branca uma praga polífaga e de difícil controle. Obtenido en línea: <https://promip.agr.br/mosca-branca-praga-polifaga-dificil-controle/>
- Borges D., Díaz A., San Juan A. & Gómez E. (2010). Metabolitos secundarios producido por hongos entomopatógenos. Obtenido en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120684008.pdf>
- Bueno, L. & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 8-16.
- Buenrostro, G. (2012). aislamiento y efectividad de *Beauveria bassiana villemín* para el control biológico de la cucaracha urbana *Periplaneta americana* L. Obtenido en línea: <http://eprints.uanl.mx/2707/1/1080227494.pdf>

- Carvajal, J. (2021). La Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) como causante del daño de la hoja de moringa y de la papa; con sus tipos de controles. Obtenido en línea: <https://palmerajunior.com/la-mosca-blanca-bemisia-tabaci-como-causante-del-dano-de-la-hoja-de-moringa-y-de-la-papa-con-sus-tipos-de-controles/>
- Carballo, M. (2004). Control Biológico de Plagas. Plaguicidas – Aspectos Ambientales. 1ª ed. – Mangua: CATIE, 2004. 232p (Serie técnica. Manual técnico/ CATIE; N° 53 ISBN 99924-0-316-0.
- Cardona, L & Soto, A., (2015). Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera: Crambidae) a diferentes hongos entomopatógenos en caña panelera. Bol. Cient. Mus. hist. Nat. U. de Caldas, 19 (2), 95-103.
- Carreiro, R. (1994). Análisis del complejo de enemigos naturales de *Bemisia tabaci* (gennadius) (homoptera: aleyrodidae), en la península de azuero, Panamá. Obtenido en línea: http://up-rid.up.ac.pa/3016/1/rossana_carreiro.pdf
- Castillo, C. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria Bassiana*, aislada de diferentes insectos en el Trujillo-Venezuela. ACADEMIA - Trujillo - Venezuela - ISSN 1690-3226, 7.
- Certis. (2018). Principales enfermedades y plagas del pimiento. Obtenido en línea: <https://certisbelchim.es/principales-enfermedades-y-plagas-del-pimiento/>
- Chiriboga, H., Gómez, G. & Garcés, K. (2015). Hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras. Obtenido en línea: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Clifton, E., Jaronski, S., Coates, B., Hodgson, E. & Gassmann, A. (2018). Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. Plos one. Vol, 13(3), pp 1-19

- Cuellar, M. & Morales, F. (2006). La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Obtenido en línea: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v32n1/v32n1a01.pdf>
- Driver, F., Milner, R. & Trueman, J. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>
- Echevarria, F. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Obtenido en línea: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/463/Trabajo%20Final%20Ode%20Graduacion%20Biblioteca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Elsalam, K., Yassin, M., Mosleffi, M., Bahkali, A", de Wit, P', McKenzie, P., McKenzie, E., Stephenson, S., Cai, L. & Hyde, K. (2010). Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. *Fungal Diversity*, 45, 21-32. DOI 10.1007/s13225-010-0063-z
- Espinoza, G. (2017). Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (charpentier) con hongos entomopatógenos en maíz. Obtenido en línea: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/7f5fb18a-9006-446e9-81ab-3987de95eacc/content>
- Faria, MR. & Wraight, SP. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237-256.
- Fransen, J. J., Winkelman, K. & Lenteren, J. C. (1987). The differential mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with the fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 50: 158-165

- Gama, L., Howard, R., Martinez, J. & Salvadores, L. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. Obtenido en línea: <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/846/709>
- Gerding, M & France, A. (2016). Hongos entomopatogenos: una alternativa para la obtencion de biopesticidas. Obtenido en línea: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/41319/NR35301.pdf?sequence=1>
- González, G. (2022). Proyecto de Investigación-Innovación en formulación de bioplaguicidas con cepas nativas de hongos entomopatógenos de plagas de hortalizas. Obtenido en línea: [https://proyectos.idiap.gob.pa/uploads/adjuntos/\(TRIPTICO\) Hongos Entomopat%C3%B3geno.pdf](https://proyectos.idiap.gob.pa/uploads/adjuntos/(TRIPTICO) Hongos Entomopat%C3%B3geno.pdf)
- Haya, C. (2018). El cultivo del pimiento, abcagro.com. obtenido en línea: <http://www.abcagro.com/hortalizas/pimiento.asp>
- Hernández C. (2019). colonización endófito en las plantas de maíz en los tejidos correspondientes a tallo y hoja. Obtenido en línea: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/6617/IIAF-M-2019-1155.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hernández-Velázquez, V., Cervantes, Z., Villalobos, F., García, L. & Peña, G. (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (coleoptera: melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. Acta Zoológica Mexicana, 27, 591 -599.
- Humber, R. (2012). USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research Unit, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, 538 Tower Road, Ithaca, NY 14853-2901, USA.
- Galán, L. (2012). Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México. Universidad autónoma de Nuevo León, México, 20-21.

- Gandarilla, F. (2012). Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas cítricas sobre *Diaphoria citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Obtenido en línea: <http://eprints.uanl.mx/2802/1/1080237547.pdf>
- García, J. (2022). Estudio de los microesclerocios formados por el hongo entomopatógeno *metarhizium robertsii* mt004: producción, caracterización y actividad insecticida. Obtenido en línea: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82054/1026270087.2022.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- García, J. E., Posadas J. B., Peticari A. & Lecuona. R. E. (2011). *Metarhiziumanisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in biological research*, 5(1), 22–27. Obtenido en línea: [http://idosi.org/abr/5\(1\)/3.pdf](http://idosi.org/abr/5(1)/3.pdf)
- García, M., Capello, S., Leshner, J. & Molina, R. (2008). Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. Obtenido en línea: <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/download/846/709>
- Godoy. (2018). Clasificación y propiedades del pimiento (*Capsicum annuum*). Obtenido en línea: <http://www.saludybuenosalimentos.es/alimentos/index.php?s1=s1&s2=s2&s3=pimiento>
- González, G., Monzón, A., Santamaria, J., Santo, U., Caballero, S., Castrejon, K. & Sanjur, M. (2021). Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglè. obtenido en línea: <https://repositorio.una.edu.ni/4450/1/pph10g643ca.pdf>
- González, N. (2019). Respuesta de *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) y sus enemigos naturales entomófagos a la colonización de plantas de melón por hongos entomopatógenos endófitos. Obtenido en línea: <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/18885/2019000001965.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

- Gualsaqui, J. (2022). Evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en los cuatro estadios de desarrollo de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en la Granja Experimental La Pradera. obtenido en línea: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/12040>
- Landa, B.B., Lopez-Diaz, C., Jimenez-Fernandez, D., Montes-Borrego, M., Munoz-Ledesma, F.J., Ortiz-Urquiza, A., Quesada-Moraga, E., 2013. In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a newdeveloped nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 128-138.
- Leucona, E. (1996). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Talleres Gráficos Mariano.
- Lozano, C. & Laberry, R. 1993. Hongos endófitos también en yuca. *Yuca Boletín Informativo* 17 (2), 5-6.
- Maranhão, EA. & Maranhão, EH. (2013). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (homóptera: aleyrodidae). *Actas de la Academia de Ciencias Agrícolas de Pernambuco*, 5, 209–242. Obtenido en línea: <http://journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/180>
- Martínez, E. (2009). Selección de hongos entomopatógenos para el control biológico de áfidos (*T. citricida*) de Coclé. obtenido en línea: http://up-rid.up.ac.pa/645/1/ellis_martinez.pdf
- Maza, N., Paz, M., Macián, J., & Fernández, J. (2013). Abundancia y frecuencia de microhimenópteros parasitoides de mosca blanca en el cultivo de pimiento en Lules, Tucumán. Obtenido en línea: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/35108874/RANA331-04-libre.pdf?1413212103=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAbundancia_y_frecuencia_de_microhimenopt.pdf&Expires=1677183324&Signature=CWxFQa5zEQ7IW00Q1GOHWfvO

[PxjjPsqvIjfNy8EZJKD8U7udSDAsNmke6V~t-
Wyim6mgIVwaZxrnA3DGJ3b9YkAz6kj1FwDbq9KfEYvXhei1h9AZViUdZYeLZ2
KtEIRZJBEbh4d4znWvkY7oS002emkmnyzuiPucX5WjgGIBXtkwKPYG1DRULf
-6KycQpHGZ8SVM4XBYRLxfeeG2SJDpdgAfDsGp8qe7Tnl-
cghntg6Z68tZhw7qSXf-
1V6o5ETPXB0cSCT5G4CPxQ9OYtOImnCaglD5aO~n1Xzb42GE4Cx4ZfG0E
UmA89FN-LB4VoqY7chOGj4dn17ExkTH96~jlw &Key-Pair-
Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://repositorio.unan.edu.ni/11992/1/100307.pdf)

Medrano, S. & Tercero, N. (2019). Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*. Obtenido en línea: <https://repositorio.unan.edu.ni/11992/1/100307.pdf>

Mendez, J. (2019). *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* Y *Trichoderma sp.* como endófitos y su efecto en el crecimiento de sorghum bicolor y en la población de *Melanaphis sacchari*. Obtenido en línea: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/26547/Tesis%20Judith%20M%C3%A9ndez%20R%C3%ADos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mendoza, A. (2013). Controladores biológicos de plagas. Boletín Hortícola. Obtenido en línea: https://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/paginas/boletin_horticola_nro_51_0.pdf

Merino, P. (2017). Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga. Obtenido en línea: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/6483/Merino_p_c.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Mier, T., Toriello, C. & Ulloa, M. (2002) Hongos microscópicos saprobios y parásitos. Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 90-96.

- Morales, A. & Cardona, C. (1996) Evaluación de diferentes hongos entomopatógenos sobre las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. Informe final Convenio CIAT – AgrEvo S.A. CIAT. Palmira. Colombia. 37 p.
- Motta, P. & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Obtenido en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/928/92819767006.pdf>
- Neupane B. (2005). Evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on honeybee (*Apis mellifera* L.) and its pest greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) [tesis maestría]. Chitwan, Nepal: Tribhuvan University.
- Nussenbaum, L. (2014). Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Obtenido en línea: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5511_Nussenbaum.pdf
- Pacheco, J. (2021). ¿Sabías que *Beauveria bassiana* también es un hongo endófito que promueve el crecimiento vegetal y protege tu cultivo? obtenido en línea: <https://ecofertilizing.pe/sabias-que-beauveria-bassiana-tambien-es-un-hongo-endofito-que-promueve-el-crecimiento-vegetal-y-protege-tu-cultivo/>
- Portalanza, D. (2011). Eficacia de cepas antagonistas y entomopatógenos para el manejo del complejo marchitez y mosca blanca en el cultivo de pimiento "*Capsicum annum*". Obtenido en línea: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/3062/1/tesis%20en%20Cultivo%20de%20Pimiento%20Diego%20Portalanza%20Peralta.pdf>
- Pucheta, M., Macias, A., Rodríguez, S. & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. obtenido en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>

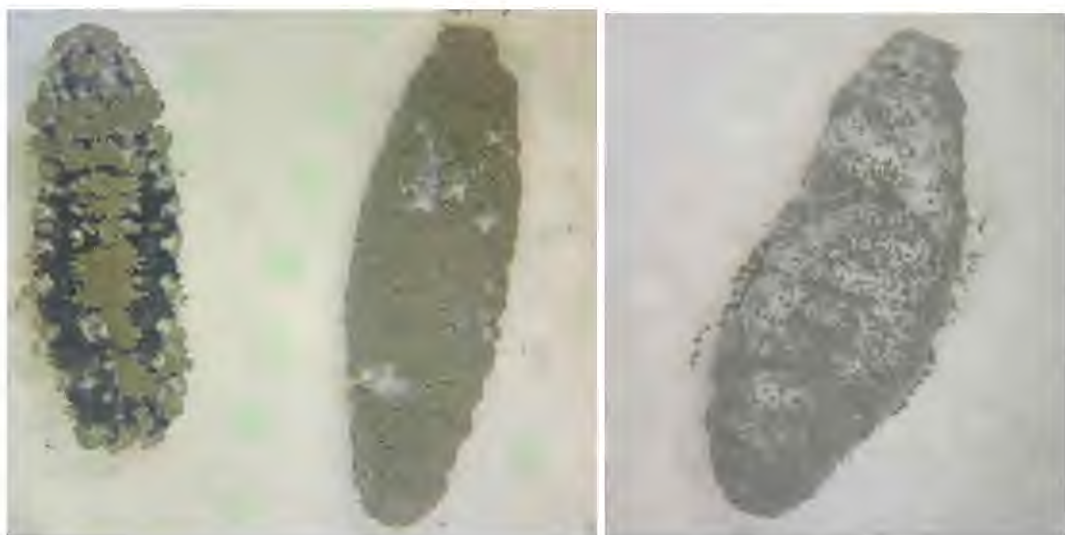
- Quezada, J. (2006). Hospederos vegetales y proceso de mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn. (hemipter:aleyrodidae) a lotes comerciales de chile serrano en ramos arizpe, coahuila. Obtenido en línea: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/Unarrow/0041.pdf>
- Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I., Delso, C., RíosMoreno, A. & Quesada-Moraga, E. (2016). Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 23-31. doi:10.1016/J.JIP.2016.03.003.
- Ríos-Moreno A. (2017). Evaluación de riesgos ecotoxicológicos derivados del empleo del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. para el control de plagas. <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/14959/2017000001648.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ríos-Velasco, C.; Pérez-Corral, D.A.; Salas-Marina, M.A.; et al. 2014. Pathogenicity of the Hypocreales fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against insect pests of tomato. *Southwestern Entomologist* 39(4), 739-750.
- Rodgers, P. B. 1993. Potential of biopesticides in agriculture. *Pestic. Sci.* 39, 117-129.
- Sánchez-Rodriguez AR, Raya-Díaz, Zamarreño AM, García-Mina JM, del Campillo MC, Quesada-Moraga E. 2018. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*. 116:90-102.
- Sánchez, E; Monserrat, Y; Ulloa, A; García, M. & Macías, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006

- Schulz, B. & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661-686. [doi:10.1017/ S095375620500273X](https://doi.org/10.1017/S095375620500273X)
- Soto, J. (2008). Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Obtenido en línea: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3804/CARACTMOLECULAR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- St. Leger, R.J., Wang, C. & Fang, W. (2011). New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Reviews*, 25, 84-88
- Stephen, R., Andrew, M., Gi-Ho Sung, J., Luangsa-ard, J., Devotto, L. & Humber, R. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103, 5, 1055-1073. DOI: 10.3852/10-302.
- Torres, M; Cortez, H; Ortiz, C; Cappello, S. & Perez, M. (2014). Cepas monospóricas de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad sobre *Galleria mellonella* en Tabasco, México. Obtenido en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v5n2/v5n2a4.pdf>
- Valle-Ramírez, S., Torres, R., Caicedo, W., Abril, R. & Villalba, D. (2020). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium spp.* de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). Obtenido en línea: https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/bitstream/RD_IKIAM/488/1/A-IKIAM-000365.pdf
- Vasquez, J. (2021). Se incrementa la producción de ají del distrito de Renacimiento, Chiriquí. Obtenido en línea: <https://www.panamaamerica.com.pa/provincias/se-incrementa-la-produccion-de-aji-del-distrito-de-renacimiento-chiriqui-1193631>

8. ANEXOS



Anexo 1. Vista en el estereoscopio con presencia de crecimiento micelial de *B. bassiana* sobre larvas de *G. Mellonella*.



Anexo 2. Vista en el estereoscopio con presencia de crecimiento micelial de *M. anisopliae* sobre larvas de *G. Mellonella*.