



“Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador”

Castillo Guamán, Jhosep Adrián

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel M. Sc.

01 de agosto del 2021

Resultado del análisis de Urkund










Document Information

Analyzed document	URKUND_Castillo_Jhosep_Trabajo_Titulación.docx (D111154339)
Submitted	8/11/2021 1:51:00 AM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	9%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.orkund.com

Firmado digitalmente por ALMA ROSEL KOCH KAISER
 DN: cn=ALMA ROSEL KOCH KAISER, o=SECURITY DATA S.A. 2
 ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION
 Motivo: Estoy aprobando este documento
 Ubicación:
 Fecha: 2021-09-01 19:56:05:00

Sources included in the report

W	URL: https://1library.co/document/zlgm1vry-beauveria-metarhizium-anisopliae-premnotypes-siembras-variedad-ampurhuay-huancavelica.html Fetched: 6/17/2021 12:46:55 PM		1
W	URL: https://es.slideshare.net/adrianasandon/ya-libro-hongos-entomopatogenos Fetched: 12/21/2020 4:21:34 AM		2
SA	PROY INV - DEIVY GUEVARA 19.09.2018.docx Document PROY INV - DEIVY GUEVARA 19.09.2018.docx (D41593346)		3
W	URL: http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf Fetched: 11/14/2020 9:01:01 AM		2
SA	PROYECTO DE TESIS FINAL SIN GRÁFICOS.doc Document PROYECTO DE TESIS FINAL SIN GRÁFICOS.doc (D19476276)		1
W	URL: https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8952/Trabajo%20de%20grado.pdf?sequence=3&isAllowed=y Fetched: 2/6/2020 9:53:17 PM		1
W	URL: https://core.ac.uk/download/pdf/33130585.pdf Fetched: 7/15/2020 6:11:23 PM		13



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador**” fue realizado por el señor **Castillo Guamán, Jhosep Adrián** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 6 de agosto de 2021

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISE
R

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL
KOCH KAISER
DN: cn=ALMA ROSEL
KOCH KAISER, o=EC
o=SECURITY DATA
S.A., 2 ou=ENTIDAD
DE CERTIFICACION
DE INFORMACION
Motivo: Estoy
aprobando este
documento
Ubicación:
Fecha: 2021-09-02
12:16:05.00

.....
Lic. Koch Kaiser, Alma Rosel M. Sc.

C. C. 1708880792



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Castillo Guamán, Jhosep Adrián**, con cédula de ciudadanía n° 1725274490, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de Rosa spp. de una florícola, Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 6 de agosto de 2021

Castillo Guamán, Jhosep Adrián

C. C. 1725274490



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

Autorización de publicación

Yo, **Castillo Guamán, Josep Adrián**, con cédula de ciudadanía n° 1725274490, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Aislamiento e identificación de dos hongos entomopatógenos y evaluación de su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 6 de agosto de 2021

Castillo Guamán, Josep Adrián

C. C. 1725274490

Dedicatoria

A mis padres, Catalina Guamán y Milton Castillo, por los consejos que me han brindado en todo momento, por el apoyo, amor y cariño que siempre ha estado presente a lo largo de toda mi vida

A mi hermana, Johanna Castillo, por su ayuda en cada paso que doy.

Jhosep Adrián Castillo Guamán

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Catalina y Milton por darme la educación, por enseñarme valores, por su guía, apoyo y amor incondicional que me han permitido ser una gran persona y cumplir esta meta. A mi hermana por ser mi compañera fiel durante toda mi vida. Siempre estaré agradecido por tenerlos en mi vida.

A mi novia, Camila Utreras, por su amor y cariño incondicional y por acompañarme en todo momento en el desarrollo de este proyecto.

A mi tutora Lic. Alma Koch M. Sc. que es una admirable persona y docente que he tenido la oportunidad de conocer, le agradezco por su apoyo a lo largo del proyecto.

A la M. Sc. María Esther Cortés por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en su laboratorio de microbiología aplicada Microbiolab.

Al Ing. Fabricio Rivadeneira por abrirme la puerta de su florícola AlpaRoses y poder realizar parte de este proyecto.

Al Ing. Francisco Flores por permitirme realizar parte del proyecto en su laboratorio.

A mis amigos, Eskarle, Oscar, Gaby, Mike por siempre estar conmigo en toda mi carrera universitaria.

Índice de contenido

Carátula	1
Resultado del análisis de Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido	8
Listado de tablas	12
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del Problema	16
Justificación del problema	16
Objetivos	18
Capítulo II: Marco Teórico	19

Generalidades	19
Cultivo rosal	19
<i>Frankliniella occidentalis</i> “Trips”	20
<i>Taxonomía</i>	21
<i>Ciclo de vida</i>	21
<i>Fecundidad</i>	25
<i>Daños en importancia agrícola</i>	25
Control biológico	26
Hongos entomopatógenos	26
<i>Mecanismo de Acción</i>	27
Características de la especie <i>Beauveria bassiana</i>	31
Características de la especie <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
Características de la especie <i>Lecanicillium lecanii</i>	32
Características de la especie <i>Penicillium oxalicum</i>	32
Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos	32
Hipótesis	35
Capítulo III: Materiales y métodos	36
Obtención de los aislamientos	36

	10
Colecta de muestras de suelo	36
Procesamiento de muestras de suelo	36
Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres	37
Descripción macroscópica	37
Descripción microscópica	37
Identificación molecular	38
Extracción ADN	38
Cuantificación de ADN	38
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	39
Secuenciación y análisis bioinformático	40
Bioensayo de patogenicidad <i>in vitro</i>	40
Concentración del inóculo	40
Recolección y cría de trips	41
Bioensayo dual	42
Análisis Estadístico y Diseño experimental	42
Capítulo IV: Resultados	44
Aislamiento e identificación morfológica de los hongos entomopatógenos	44

<i>Caracterización de Beauveria bassiana</i>	44
<i>Caracterización de Penicillium oxalicum</i>	46
Identificación molecular de los hongos entomopatógenos	47
<i>Extracción y cuantificación de ADN</i>	47
<i>Reacción en cadena de la polimerasa – PCR</i>	48
<i>Secuenciación y análisis bioinformático</i>	50
Bioensayo de patogenicidad <i>in vitro</i>	50
<i>Identificación morfológica de F. occidentalis “Trips”</i>	50
<i>Bioensayo dual</i>	54
Capítulo V: Discusión.....	58
Capítulo VI: Conclusiones	63
Capítulo VII: Recomendaciones	63
Bibliografía	64

Listado de tablas

Tabla 1 Permanencia de los diferentes estadios de desarrollo de <i>Frankliniella occidentalis</i> con una temperatura de 25-30 oC.	22
Tabla 2 Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de la región ITS1- DNAr 5,8S-ITS de hongos.....	39
Tabla 3 Componentes de la reacción de amplificación.....	40
Tabla 4 Tratamientos en el control de trips (<i>Frankliniella occidentalis</i>) con los dos hongos entomopatógenos.....	43
Tabla 5 Valores obtenidos del proceso de cuantificación de las muestras de ADN	48
Tabla 6 Identidad de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo de cultivos de rosas basado en la amplificación del espacio interno ITS de la región del DNA ribosomal, según BLAST en NCBI.	50
Tabla 7 Porcentajes promedio de mortalidad de <i>F. occidentalis</i> , expuestas a diferentes concentraciones de <i>B. bassiana</i> y <i>P. oxalicum</i> en condiciones de laboratorio.....	56

Listado de figuras

Figura 1 Estados de <i>F. occidentalis</i>	24
Figura 2 Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno.....	30
Figura 3 Organización de las unidades del ADN ribosomal en el genoma fúngico y de los sitios de reconocimiento de los primers universales ITS1 e ITS4.	34
Figura 4 Características macroscópicas de la especie <i>Beauveria bassiana</i>	45

Figura 5 Características microscópicas de la especie <i>Beauveria bassiana</i>	45
Figura 6 Características macroscópicas de la especie <i>Penicillium oxalicum</i>	46
Figura 7 Características macroscópicas de la especie <i>Penicillium oxalicum</i>	47
Figura 8 PCR del aislamiento fúngico <i>B. bassiana</i>	49
Figura 9 PCR del aislamiento fúngico <i>P. oxalicum</i>	49
Figura 10 Caracterización morfológica de un adulto de <i>Frankliniella occidentalis</i>	51
Figura 11 Caracterización de la cabeza de <i>Frankliniella occidentalis</i>	51
Figura 12 Caracterización de las antenas de <i>Frankliniella occidentalis</i>	52
Figura 13 Caracterización de las alas de <i>Frankliniella occidentalis</i>	52
Figura 14 Caracterización de las patas de <i>Frankliniella occidentalis</i>	53
Figura 15 Chaetotaxia en Pronoto y Metanoto de <i>Frankliniella occidentalis</i>	53
Figura 16 Morfología de los segmentos del abdomen de <i>Frankliniella occidentalis</i>	54
Figura 17 Acción de los hongos en estudio sobre <i>Frankliniella occidentalis</i> a nivel de laboratorio	54
Figura 18 Porcentajes promedio de mortalidad de <i>F. occidentalis</i> según la concentración utilizada.	56
Figura 19 Porcentajes promedio de mortalidad de <i>F. occidentalis</i> según el hongo utilizado.	57

Resumen

El cultivo de rosas en el Ecuador genera un gran aporte económico al país. *Frankliniella occidentalis* es una de las plagas que más afecta este tipo de cultivo, por tal razón realizar un manejo integrado de plagas en el cual se limite el uso de agroquímicos y optimice el uso de controladores biológicos es de vital importancia. La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar dos hongos entomopatógenos y evaluar su antagonismo sobre *F. occidentalis*. Se realizó un muestreo de suelo en la florícola AlpaRoses S.A. para realizar la búsqueda de dos hongos entomopatógenos, los cuales fueron aislados en medios de cultivo microbiológicos, de esta manera se obtuvo en el laboratorio de Microbiolab un aislamiento de la especie *Beauveria bassiana* y un aislamiento del hongo *Penicillium oxalicum*; las identidades de estos hongos fueron confirmadas por medio de un análisis molecular y bioinformático. Se evaluaron mediante un bioensayo dual contra especímenes adultos de *F. occidentalis* a nivel de laboratorio durante siete días y se observó que los hongos en estudio son antagonistas de la plaga. El tratamiento que mejor resultado arrojó fue *B. bassiana* con una concentración de 10^8 conidias/mL obteniendo una mortalidad de 77,78% y se mostró por primera vez al hongo *P. oxalicum* como un posible controlador biológico de *F. occidentalis*.

Palabras clave:

- **CONTROL BIOLÓGICO**
- **CULTIVO DE ROSAS**
- **HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**
- **FRANKLINIELLA OCCIDENTALIS**

Abstract

Rose cultivation in Ecuador generates a great economic contribution to the country. *Frankliniella occidentalis* is one of the pests that most affects this type of crop, for this reason, carrying out an integrated pest management in which the use of agrochemicals is limited and the use of biological controllers is optimized is of vital importance. The present research aimed to isolate and identify two entomopathogenic fungi and evaluate their antagonism on *F. occidentalis*. Soil sampling was carried out at the florícola AlpaRoses S.A. to search for two entomopathogenic fungi, which were isolated in microbiological culture media, in this way, an isolation of the *Beauveria bassiana* species and an isolation of the *Penicillium oxalicum* fungus were obtained in the Microbiolab laboratory; the identities of these fungi were confirmed by means of a molecular and bioinformatic analysis. They were evaluated by means of a dual bioassay against adult specimens of *F. occidentalis* at the laboratory level for seven days and it was observed that the fungi under study are antagonists of the pest. The treatment with the best results was *B. bassiana* with a concentration of 108 conidia / mL, obtaining a mortality of 77.78% and the fungus *P. oxalicum* was shown for the first time as a possible biological controller of *F. occidentalis*.

Keywords:

- **BIOLOGIC CONTROL**
- **GROWING ROSES**
- **ENTOMOPATHOGENIC FUNGI**
- ***FRANKLINIELLA OCCIDENTALIS***

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

El cultivo de rosas en el Ecuador es de vital importancia por el aporte económico que genera al país. Las rosas producidas poseen prestigio y reconocimiento en el mercado internacional por su calidad. El 60% de las flores ecuatorianas se vende en los Estados Unidos y el 40% restante se comercializa en Rusia, Europa y Sudamérica (Yanchapaxi, Calvache, & Lalama, 2010). Este tipo de cultivo posee varios problemas fitosanitarios, los invernaderos donde se los siembra presentan condiciones ambientales óptimas de temperatura, humedad y luminosidad que favorecen el crecimiento de los rosales y de plagas como *Frankliniella occidentalis* "Trips". *F. occidentalis* es un insecto que causa daño en el cultivo de rosas generando necrosamiento en el tejido vegetal, utilizan su aparato bucal para succionar y picar el contenido celular, disminuyendo la calidad de la flor (Muñoz, Suárez, & Benavides, 2008) e impidiendo la exportación del producto, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas a las empresas que exportan flores.

Según (USDA, 2010), el departamento de agricultura de Estados Unidos de América (APHIS, por sus siglas en inglés) presentó en 2010 un reporte de las plagas procedentes del Ecuador y hace mención a *F. occidentalis* como una de las de mayor incidencia.

Justificación del problema

Actualmente, *F. occidentalis* es una de las plagas, junto con los ácaros, que tiene más incidencia en el cultivo de rosas (Pujota, 2013). Por lo tanto, realizar un manejo integrado de este tipo de plagas es fundamental para reducir su incidencia y prevenir las afecciones que ocasiona a las rosas.

Pujota (2013), menciona que la estrategia más utilizada para el control de Trips es el

uso de sustancias químicas; pero estos químicos pueden producir efectos adversos en la salud de las personas que aplican la sustancia debido a falta de protección personal y capacitación, también se conoce que estos productos contribuyen en la contaminación ambiental y su uso continuo ha llevado al desarrollo de resistencia a insecticidas dentro de las poblaciones de *F. occidentalis* y la interrupción de los programas de MIP (Manejo integrado de Plagas) para otras plagas (Rodríguez, 2015; Stuart Reitz, 2020). En la actualidad, el mercado internacional ha exigido la obtención de flores de alta calidad, en las cuales se limite el uso de agroquímicos. Por tal motivo, se ha optado por utilizar controladores biológicos como es el caso de los hongos entomopatógenos para erradicar plagas de los cultivos de rosas.

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar a los insectos plaga a través de la cutícula, debido a que las esporas germinan y con el micelio matan a sus presas. Existen diversos hongos de los cuales se conoce un gran potencial como controladores biológicos, entre ellos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, entre otros; y de reciente descubrimiento *Penicillium oxalicum* (Motta & Murcia, 2011; Kumar *et al.*, 2018). En adición, conocer los hongos entomopatógenos presentes en una florícola nos permite seleccionar la especie mejor adaptada y pronosticar el éxito de los hongos en el control de plagas (Gonzales *et al.*, 2019). Actualmente las florícolas del Ecuador están implementando laboratorios de investigación, donde uno de los objetivos de estudio es el control biológico.

Por otro lado, en Ecuador existen pocos estudios de la efectividad de hongos entomopatógenos, los aislamientos se obtienen de diversos laboratorios o de productos importados de otros países y no se detalla una identificación a nivel molecular la cual da resultados más precisos.

Objetivos

Objetivo general

- Aislar e identificar dos hongos entomopatógenos y evaluar su antagonismo en la plaga *Frankliniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador.

Objetivos Específicos

- Aislar dos hongos entomopatógenos presentes en cultivos de *Rosa* spp. en medios de cultivo microbiológicos.
- Identificar los hongos entomopatógenos mediante métodos macroscópicos, microscópicos y moleculares.
- Identificar y cultivar *F. occidentalis* "Trips" a nivel de laboratorio.
- Determinar el antagonismo de dos hongos entomopatógenos sobre *Frankliniella occidentalis* en cultivos de *Rosa* spp. mediante bioensayo dual a nivel de laboratorio.

Capítulo II: Marco Teórico

Generalidades

A partir de los años 80 inició el crecimiento de la producción de rosas en Ecuador. Las rosas producidas por países de la zona ecuatorial poseen prestigio y reconocimiento en el mercado internacional por su elevada calidad. La rosa ha sido y es la flor ornamental más estimada en el mercado. Desde la década de los 90 su liderazgo se ha hecho notar debido a la mejora de las variedades, la oferta durante todo el año y también por su creciente demanda (Infoagro, 2009). El 60% de las flores ecuatorianas se vende en los Estados Unidos y el 40% restante se comercializa en Rusia, Europa y Sudamérica (Yanchapaxi, Calvache, & Lalama, 2010). Actualmente, el mercado internacional exige la obtención de flores limpias y con altos estándares de calidad, en las cuales se haya limitado el uso de agroquímicos.

El problema en la producción de rosas, radica en buscar nuevas alternativas que ayuden a la eliminación de las plagas, ofreciendo mayor protección e inocuidad en los trabajadores de las florícolas en Ecuador. Dentro de las plagas más frecuentes en el cultivo de rosa se encuentran los trips, pulgón y araña roja (ácaros) (Guagalango, 2020).

Cultivo rosal

La rosa es un cultivo perenne que pertenece a la familia Rosaceae, género *Rosa*, esta especie se produce bajo el sistema de monocultivo. Sus plantas pueden producir por más de 15 años, tiene hojas compuestas por folios que van desde uno a siete. Los tallos son largos con una longitud que va desde 0,3 m hasta 1,2 m; son el producto final para la exportación y por tal razón su calidad es indispensable y que vaya acompañado de características sobresaliente en cuanto a su botón foral tales como: color, tamaño, consistencia y diámetro; factores que determinan el mercado del

producto. Actualmente en el Ecuador el área aproximada de producción es de 4000 ha, lo que representa un ingreso importante para el país (Pujota, 2013).

Sus requerimientos agroclimáticos son:

- Suelo: son necesarios suelos con buena aireación y drenaje, tolera suelos ácidos pero no cuando hay niveles elevados de calcio.
- Iluminación: la rosa es una planta de días largos, su producción se incrementa en proporción a la luz que recibe.
- Temperatura: la temperatura óptima oscila entre los 17°C – 25°C.

La rosa es un arbusto que bajo un sistema de podas se puede obtener tallos con la calidad requerida por los mercados internacionales de forma permanente.

En estas rosas de corte intensivo, se presentan varios problemas fitosanitarios que afecta su calidad, entre las que tenemos:

- **Plagas fungosas y bacterianas:** como Mildiu vellosa *Peronospora sparsa*, Oidio *Sphaerotheca pannosa*, Botrytis *Botrytis cinérea*, Tumores *Agrobacterium tumefaciens*
- **Plagas insectiles y acaros:** arañitas *Tetranychus urticae*, Pulgón *Macrosiphum rosae*, Trips *Frankliniella occidentalis*

Los invernaderos donde se los siembra presentan condiciones ambientales óptimas de temperatura, humedad y luminosidad que favorecen el crecimiento de los rosales y de plagas como *Frankliniella occidentalis* “Trips” (Herrera, 2013).

***Frankliniella occidentalis* “Trips”**

Trips es el nombre que se les da genéricamente a los insectos del orden Thysanoptera, tiene su origen en California y su descubrimiento se dio en Holanda cuando cultivos de algodón se encontraban infestados por la plaga luego de importar material vegetal de Estados Unidos (Liñan, 1998).

Los trips son insectos delgados y pequeños de alrededor de 3 mm de longitud, su cuerpo es alargado con la cabeza más ancha que larga, mostrando un rostro o cono bucal un poco largo y asimétrico, con piezas bucales en disposición opistognata,

Frankliniella occidentalis es una plaga que causa daño en el cultivo de rosas, genera necrosamiento en el tejido vegetal, tanto las larvas como los adultos utilizan su aparato bucal para succionar y picar el contenido celular, disminuyendo la calidad de la flor (Muñoz, Suárez, & Benavides, 2008).

Taxonomía

Según Lacasa (1990), la ubicación taxonómica de los “Trips” es la siguiente:

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Thysanoptera

Suborden: Terebrantia

Familia: Thripidae

Subfamilia: Thripinae

Tribu: Thripini

Género: *Frankliniella*

Especie: *Frankliniella occidentalis* P.1895

Ciclo de vida

Según Fainstein (2003), la duración del ciclo de vida de *F. occidentalis* depende de la temperatura, humedad relativa, planta hospedera, calidad y cantidad de alimento disponible (Tabla 1).

Tabla 1

Permanencia de los diferentes estadios de desarrollo de Frankliniella occidentalis con una temperatura de 25-30°C.

Estado	Duración en días
Huevo	2-4
Ninfa I	1-2
Ninfa II	3-5
Prepupa	1
Pupa	2-4
Preoviposición	2
Longevidad hembra adulta	40-75
Longevidad macho adulto	30-50
Ciclo de desarrollo (huevo-adulto)	9-16
Período de desarrollo que ocurre en el tejido	6-11

Nota. Tomado de *Manual para el control de plagas y enfermedades en cultivos florales* (p. 28), por R. Fainstein, 2003, Abya Yala.

Reitz (2020); Cárdenas & Corredor (1989) reportan que el ciclo de vida de *F. occidentalis* es el que se describe a continuación y se observa en la figura 1:

Huevo: Opaco, reniforme (en forma de riñón) y de unos 200 µm de largo; insertado en la epidermis y la capa mesófila de la planta huésped. Los huevos se pueden poner en hojas, estructuras florales o frutos.

Larvas: Hay dos estadios larvarios, que tienen forma de huso y son de color blanco cremoso a amarillo. La larva de segundo estadio no tiene ocelos ni ojos compuestos y el pigmento ocelar presenta un color rojo. Muestra cinco segmentos antenales y cono bucal más esclerotizado y tiene gran actividad alimenticia. Los estadios primero y segundo se pueden diferenciar examinando el número y la ubicación de pequeñas setas en el abdomen. Estos patrones setales difieren entre los sexos para

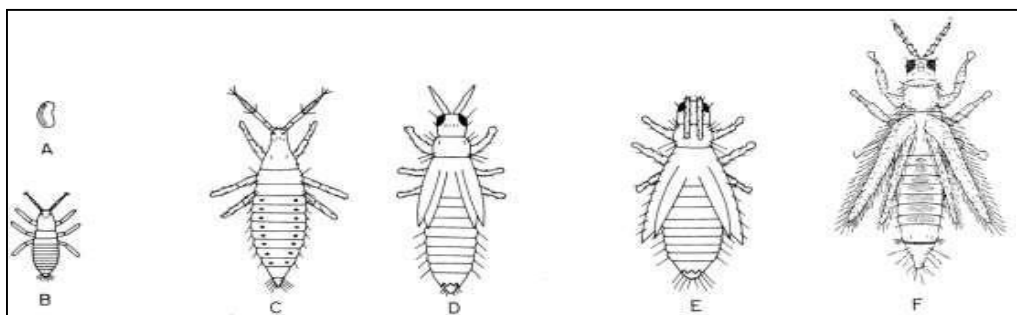
cada estadio, lo que también permite diferenciar los sexos. Las larvas son móviles, pero tienden a residir en lugares ocultos de las plantas, como dentro de las flores u hojas en desarrollo, o debajo del cáliz de los frutos.

Prepupa y Pupa: Hay dos estadios de pupa, ninguno de los cuales se alimenta. Aunque es capaz de moverse, ninguna etapa de pupa se mueve activamente a menos que sea perturbada. Dependiendo de la arquitectura de la planta hospedante, los trips de las flores occidentales pueden caer al suelo para convertirse en crisálidas. La primera etapa de pupa, la propupa tiene brotes de alas cortas y las antenas sobresalen hacia adelante de la cabeza. La pupa tiene brotes de alas que se extienden más de la mitad a lo largo del abdomen y las antenas se curvan hacia atrás sobre la cabeza. Ambas etapas de pupa suelen ser de color blanco a crema.

Adulto: Por lo general, mide menos de 2 mm de largo, el adulto es delgado con alas estrechas y con flecos. Las hembras tienen el abdomen en forma de huso y su color varía de amarillo-marrón a casi negro, como se describió anteriormente. La hembra de la cepa invasora de la plaga es típicamente de color amarillo pardusco con marcas de color marrón oscuro en la parte medial del abdomen. El macho adulto es más pequeño que la hembra, tiene un abdomen más estrecho y suele ser de color blanco amarillento. Las hembras y los machos son macrópteros (es decir, tienen alas completamente desarrolladas).

Figura 1

Estados de *F. occidentalis*.



Nota. **A.** Huevo, 0.27 mm de largo por 0.11 mm de ancho. **B.** Ninfa de primer instar o larva de primer estadio, 0.55 mm de longitud. **C.** Ninfa de segundo instar o larva de segundo estadio, 1.33 mm de longitud. **D.** Prepupa de 1.1 mm de longitud. **E.** Pupa de 1.3 mm de longitud aproximadamente. **F.** Hembra adulta de *F. occidentalis*.

Adaptado de *Biología del Trips Frankliniella occidentalis (Pegande) (Thysanoptera: Thripidae) sobre crisantemo Chrysanthemum morifolium L. Bajo Condiciones de Laboratorio.* (p.74), por E. Cardenas & D. Carredor, 2019, *Agronomía Colombiana*. Vol VI.

Los trips con frecuencia presentan la forma de reproducción partenogenética.

La hembra pone huevos con forma de riñón de un tamaño de 200 µm de largo colocándolos en tejidos tiernos de las yemas y en la vena central del envés de las hojas, en pecíolos o en yemas florales, estos eclosionan entre 5 a 7 días. Después aparecen unas larvas muy pálidas y activas, las cuales pasan por dos estadios de color blanco cremoso a amarillo y hasta de 1 mm de largo; a continuación pasan a un periodo prepupal donde no se alimenta y luego un estado pupal, estos estadios se dan en el suelo entre residuos vegetales. Se ha definido que las larvas requieren de 8 a 20 días para convertirse en adultos, los cuales son de color amarillo-dorado, marrón o negro. De 10 a 12 generaciones de trips se producen al año (Guagalango, 2020).

Fecundidad

Los Trips ponen 3 huevos/día cada hembra fecundada, de los cuales el 85% son hembras y el 15% son machos. Tiene reproducción tanto sexual como asexual (por partenogénesis) con datos similares de fertilidad en los dos casos. Los Trips hembra aproximadamente viven de 2 a 86 días y durante este tiempo pueden poner 317 huevos en partenogénesis y 301 en forma sexual, por dicha particularidad es muy acentuada la incidencia de Trips, ya que alcanza un número de individuos muy elevado (Vergara, 2005).

Daños en importancia agrícola

El perjuicio que causan los Trips radica fundamentalmente en los hábitos alimenticios que presentan y los daños que ocasionan. Según Lino *et al.*, (1998), las tres principales causas que ocasionan daño son:

- **Al ovipositar:** las hembras introducen los huevos en el tejido vegetal ocasionando necrosis. En el caso de que el huevo sea puesto en el estilo de las flores pueden perturbar el crecimiento del tubo polínico del grano de polen, lo que impide la fecundación.
- **Al alimentarse:** las flores son las que más daño sufren, ya que los trips se introducen entre los pétalos en la etapa en que los sépalos empiezan a abrirse, usan esta parte de la flor para alimentarse, copular y ovipositar, causando manchas, decoloraciones y deformaciones que incluso dificultan que los botones florales se abran.
- **Al transmitir enfermedades:** Esto se puede notar en varios panoramas en los que la plaga mencionada está implicada en el transporte de esporas de hongos y bacterias de una planta a otra. También se ha observado que es un vector de virus como el virus del bronceado del tomate TSWV que afecta a varias familias botánicas (Herrera, 2013).

Control biológico

El control biológico se basa en el uso de cualquier organismo ya sea bacterias, hongos, amebas, rickettsias; protozoarios, virus, nemátodos insectos benéficos: predadores o parasitoides, para producir enfermedades específicas en los agentes que se quiere eliminar (Rodríguez, 1993).

El uso de controladores biológicos en este caso entomopatógenos, engloba el manejo adecuado de microorganismos para tomar los más efectivos y el uso de insecticidas microbiales, que son formulaciones o productos comerciales de los entomopatógenos o de sus toxinas usadas en el control de insectos. Por esta razón, los entomopatógenos son una poderosa herramienta que nos ofrece una alternativa para el control de plagas y que no representan un riesgo para el medio ambiente (Jiménez, 2009).

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son los organismos de mayor importancia en el control biológico de plagas de insectos, los que casi en su totalidad son susceptibles de padecer las enfermedades causadas por estos hongos.

Rojas (2006) manifiesta que los hongos entomopatógenos requieren de una humedad alta para poder infectar a su hospedero, por tal razón, el ataque de las plagas es más frecuente cuando las condiciones de humedad son elevadas, esto ocurre en períodos de lluvia. Existen factores de los cuales depende la eficacia de los hongos contra los insectos plaga.

- Especie y/o aislamiento específico del hongo entomopatógeno.
- Etapa de vida susceptible del insecto.
- Humedad alta (de 80 a 100 %) y temperatura entre 25 y 30 °C.
- Uso racional y selectivo de agroquímicos durante el ciclo del cultivo o fuera de él para evitar desfavorecer la acción del hongo entomopatógeno.

Para el control biológico de trips se han identificado diferentes hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *L. lecanii* y de reciente descubrimiento *P. oxalicum* (Motta & Murcia, 2011; Kataria *et al.*, 2018).

Mecanismo de Acción

Es difícil determinar con precisión los mecanismos que se producen cuando un hongo entomopatógeno ataca a un insecto plaga. La mayoría de los hongos de plantas y vertebrados infectan al hospedante por medio de la cutícula; por tal razón es de suma importancia el contacto entre la conidia del hongo y la cutícula del insecto para el inicio del proceso infeccioso. Gomez *et al.*, (2014) describen el desarrollo de la micosis en las siguientes etapas:

- **Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto**

La adhesión es el contacto entre la conidia del hongo y la superficie del insecto. Esta unión se debe a las características físicas y químicas tanto de la conidia como de la superficie del insecto. En algunos casos, la adhesión de ciertos hongos es un proceso no específico y en otros casos es un proceso específico ya que la adsorción de la conidia a la superficie ocurre por el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto y por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesina (Téllez *et al.*, 2009). Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas.

- **Germinación de la conidia**

Se da la germinación de la conidia sobre el integumento del insecto, en este proceso se genera un tubo germinativo y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo. La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas

cuticulares del insecto (Pucheta *et al.*, 2006). El tiempo de germinación depende de la cepa y ocurre aproximadamente entre 12 a 20 horas.

- **Penetración del integumento**

Este proceso ocurre debido a la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Aquí se produce la acción de 2 mecanismos uno físico y otro químico, en el primero la estructura de penetración rompe las áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula debido a la presión que ejerce. Por otro lado en el mecanismo químico ocurre la acción de las enzimas, principalmente proteasas, lipasa y quitinasas, las cuales degradan el tejido y facilita la penetración física (Téllez *et al.*, 2009). El tiempo de penetración es de 8 a 12 horas.

- **Multiplicación del hongo en el hemocele**

Cuando el hongo llega al hemocele, la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas.

- **Producción de toxinas**

La producción de toxinas por parte de los hongos matan al insecto, pero al parecer algunos hongos no producen toxinas sino que matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas causan problemas fisiológicos en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis (Téllez *et al.*, 2009); estas tienen propiedades insecticidas, producen degeneración en los tejidos debido a la pérdida de integridad estructural de las membranas y también por la deshidratación de las células por pérdida de fluido, además evaden el sistema inmune (producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular) del insecto, activado a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Pucheta *et al.*, 2006). Las toxinas producidas pueden ser enzimas como lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas o metabolitos secundarios, cuya

producción depende de diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, entre otros.

- **Muerte del insecto y Colonización**

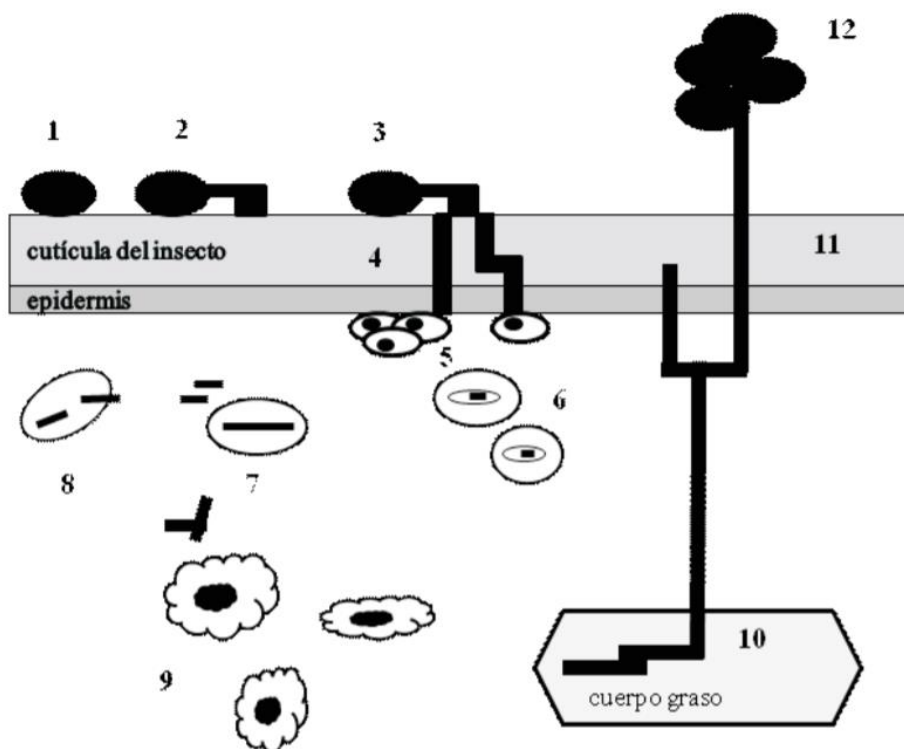
Sucede generalmente antes de la colonización completa del hemocele del insecto debido, en su mayoría, por la acción de las toxinas. La muerte del insecto marca la finalización de la fase parasítica y el inicio la fase saprófita. El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales. Una vez muerto el insecto, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo todos los órganos del hospedero. Una vez colonizado el insecto, generalmente los hongos producen sustancias antibacterianas que obstaculizan la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia. El hongo se demora en colonizar de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo.

- **Emergencia, Esporulación y diseminación**

Si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, (\geq a 90%) el hongo surge hacia el exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y producen más conidias sobre el cadáver para infectar a otros insectos. Si las condiciones del ambiente no son favorables, el hongo se queda en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde es capaz de vivir por algunos meses. Si las hifas emergen al exterior se da la producción de conidias o esporas aproximadamente 24 a 48 horas. Para la diseminación el viento, lluvia, los animales, el hombre son el medio por el cual las conidias del hongo se diseminan en busca de nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección.

Figura 2

Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno



Nota. 1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del tubo germinativo, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, 5. Acumulación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el hemocele, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Diseminación de las esporas.

Adaptado de *Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos* (p.75), por A. Téllez, M Cruz, Y. Mercado, A. Asaff, A. Arana, 2019, *REVISTA MEXICANA DE MICOLOGÍA*. Vol 30.

Características de la especie *Beauveria bassiana*

B. bassiana se caracteriza por tener conidios de globosos a subglobosos de 2-3 x 2.0-2.5 μm y las células conidiógenas (3.8-7 x 1.3-1.8 μm) forman densos racimos irregularmente agrupados, las fiálides están hinchadas en la base y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag (García *et al.*, 2011). El crecimiento de las colonias en medios de cultivo microbiológico es de 0,6-2,3 cm en 8 días a 20 °C, de color blanco con una apariencia cremosa y pulverulenta con abundantes conidias. Para la germinación de las conidias la temperatura óptima es entre 25 y 30 °C (mínimo de 10° C y máximo de 30° C), su crecimiento se ve influenciado también por el pH, el óptimo es de 5,7- 5,9 y para la formación de conidios de 7-9 (Schapovaloff, 2012). El hongo *B. bassiana* es conocido porque causa la enfermedad denominada “muscardina blanca”; esta designación se utiliza para describir un tipo de enfermedades fúngicas que convierten a algunos insectos en momias blancas que tienen un parecido similar al algodón (Steinhaus, 1985).

Características de la especie *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae posee dos variedades cuya diferencia fundamental es el tamaño de sus conidias: la variedad más común *anisopliae* de conidios pequeños (3,5-9,0 μm) y la variedad *major* de conidios grandes (9,0-18 μm). En medios de cultivos microbiológicos las colonias crecen lentamente alcanzando hasta 2 cm en 10 días a 20 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C y el pH más adecuado para su desarrollo es de 3,3 a 8,5. Esta especie requiere de una humedad muy alta para que se desarrollen los conidias (Schapovaloff, 2012). La colonia presenta una coloración que va desde el verde oliva hasta el verde oscuro, esto se da por la maduración de las conidias, con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana (García *et al.*, 2011).

Características de la especie *Lecanicillium lecanii*

L. lecanii tiene una coloración amarillenta y revés amarillo intenso, estos hongos alcanzan a los 10 días un diámetro de 15 a 25 mm, la colonia es por lo general es simétrica. El conidióforo sostiene a las fiálides, los cuales son erectos, anchos en la base y terminan en una punta delgada por donde salen las conidias, generalmente en grupos de dos a seis, aunque también hay algunos solitarios. Miden de 11 a 30 μm x 1.5 a 2 μm . Las conidias están en grupos formando cabezuelas, son elipsoidales de 2-4 μm x 1-1.5 μm . *L. lecanii* está ampliamente distribuido, tiene una gran afinidad por la plaga de la mosca blanca, además de la especie *Thrips palmi* infectando a ninfas y adultos (Montilla, 2013).

Características de la especie *Penicillium oxalicum*

Las colonias de *P. oxalicum* presentan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10 días. El micelio es inconspicuo, de color blanco o amarillo claro en las áreas algodonosas y en el centro de color verde. El revés es amarillo claro, marrón o naranja. Esta especie produce abundantes conidias y son de color verde. Los conidióforos crecen a partir del micelio dando lugar a estructuras diverticiladas y asimétricas. El estipe tiene un tamaño de 200-400 μm de longitud, son delgadas y lisas (Roselló, 2003). Métulas en grupos de 2 a 4, y de 15-23 μm de largo. Fiálides con forma característica de botella, 10-15 μm de largo. Conidios largos, elípticos, hialinos, de 3.2-5.0 μm de diámetro (Arias & Piñeros, 2008).

Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos y su caracterización morfológica y molecular es un paso esencial en la selección de especies fúngicas como agentes de control biológico de insectos (Boucias *et al.*, 2000). La caracterización morfológica se basa en el estudio de las estructuras macroscópicas (aspecto, color de las colonias y la

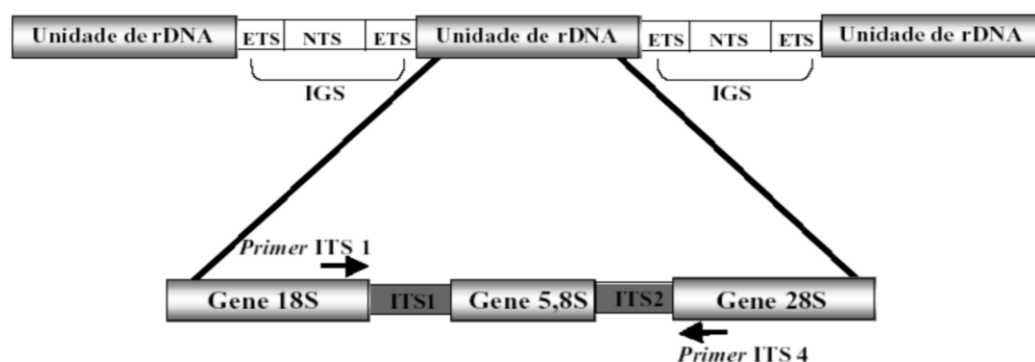
velocidad de crecimiento) y microscópicas (la forma y tamaño de las hifas, conidióforos, fiálides y conidios); en especial, la forma y tamaño de los conidios que sirven para la identificación de las especies de *Isaria*, *Beauveria* y *Metarhizium*. Esta manera de identificación permite diferenciar especies de hongos entomopatógenos y seleccionar cepas o variedades que difieren entre sí. Sin embargo, ya que algunas especies son pleomórficas es bastante frecuente observar variaciones morfológicas de las células conidiógenas y conidias por lo que su identificación se hace más dificultosa (Schapovaloff, 2012).

El avance de numerosas técnicas moleculares nos ha permitido el análisis el ADN. Una de las técnicas más destacadas es la “reacción en cadena de la polimerasa” PCR, la cual se basa en la amplificación de secuencias de ADN en presencia de “cebadores” (primers), ADN polimerasas y los precursores del ADN (dideoxinucleótidos). Dos de métodos basados en PCR son utilizados para la identificación de hongos entomopatógenos: (1) los métodos inespecíficos donde se encuentra la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que se utilizó ampliamente para estudiar la variabilidad genética interespecífica e intraespecífica de *B. bassiana* (Becerra *et al.*, 2006); (2) los métodos de PCR específicos como PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) y el método de ISSR (Inter-Simple-Sequence-Repeats) generan un perfil de múltiples bandas de ADN, el cual es comparado para determinar la variabilidad genética (Wang *et al.*, 2005). Una de las primeras aplicaciones de PCR en hongos fue la amplificación de ADN ribosomal (ADNr). Las secuencias de ADNr se exhiben como un “cluster” génico, el cual se repite en “tándem” centenas de veces. Cada unidad de repetición (cluster génico) incluye 3 genes: ADNr 18S, ADNr 5,8S y ADNr 28S, que son separados por dos regiones ITS (espaciadores transcritos internos). Como los genes 18S y 28S tienen regiones altamente conservadas, se desarrollaron primers (generalmente ITS1 e ITS4)

universales para la amplificación de la región comprendida entre el ITS1, 5,8S y el ITS2 de cualquier especie fúngica (figura 3). Los análisis realizados de la comparación de las secuencias de genes de ADN ribosomal y los ITS posibilitaron dejar en claro las relaciones filogenéticas entre varios hongos entomopatógenos (Schapovaloff, 2012; Inglis & Tigano, 2006). Todo esto resulta muy importante en la taxonomía ya que los resultados de caracterización morfológica y técnicas moleculares en hongos se pueden comparar para tener una mayor precisión en la identificación de especies fúngicas y analizar la variabilidad genética entre las poblaciones de los hongos entomopatógenos (Schapovaloff, 2012).

Figura 3

Organización de las unidades del ADN ribosomal en el genoma fúngico y de los sitios de reconocimiento de los primers universales ITS1 e ITS4.



Nota. Obtenido de *Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate Ilex paraguayensis en la provincia de Misiones.* (p.64), por M. Schapovaloff, 2013, *Naturalis*.

Hipótesis

Los aislamientos identificados de los hongos entomopatógenos eliminan la plaga *Frankliniella occidentalis* "Trips" en cultivos de *Rosa* spp. a nivel de laboratorio.

Capítulo III: Materiales y métodos

El presente estudio tiene como meta aislar e identificar dos hongos entomopatógenos que sirvan como agentes de biocontrol para la plaga de *F. occidentalis* "Trips" en cultivos de rosas. Entre las especies que se pretende aislar están *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, ya que a lo largo del tiempo, diversos estudios han demostrado que estos hongos pueden eliminar diversas plagas; y *Penicillium oxalicum* ya que recientemente se ha informado que puede ser un potencial hongo entomopatógeno.

Obtención de los aislamientos

Colecta de muestras de suelo.

La colecta se realizó en cultivos de rosas en la Florícola AlpaRoses S.A. ubicada en la parroquia de Conocoto, provincia de Pichincha. Se seleccionaron 4 bloques en los que había presencia de la plagas *F. occidentalis*. Las muestras de suelo se colectaron a una profundidad de 10 cm y se colocan en bolsas de plástico debidamente etiquetadas. En cada sitio de muestreo, se tomó una muestra compuesta de 500g a partir de 5 submuestras de 100g tomadas aleatoriamente.

Procesamiento de muestras de suelo

En el laboratorio se mezcló muy bien las muestras compuestas y se tomó alícuotas de 10g de suelo. A partir de estas alícuotas se preparó diluciones sucesivamente, utilizando 90 mL de agua peptona hasta alcanzar una dilución 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se colocó 100 μ l en la superficie del medio de cultivo selectivo Agar avena Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (OM-CTAB) (el cual se recomienda para aislar *B. bassiana* y *M. anisopliae*) y luego se extendió utilizando un asa de Digrafsky. De las diluciones 10^{-2} se realizó el mismo procedimiento en medio de cultivo SDA. Posteriormente de las colonias obtenidas en los medios de cultivos OM-CTAB y

SDA se seleccionaron las que presentaban características similares a los hongos en estudio y se aislaron en medio de cultivo PDA con el fin de obtener colonias puras.

El medio selectivo OM-CTAB se preparó de la siguiente manera: 20 g de harina de avena + 1 litro de agua destilada; se esterilizó durante 20 minutos a 120°C y luego se filtró; se añadió agua estéril hasta alcanzar el volumen original de 1 litro y posteriormente se añadieron 20 g de agar, 0.6g de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 0.5g de cloranfenicol y agua estéril hasta alcanzar 1L (Sharma *et al*, 2020).

Identificación y caracterización de los hongos entomopatógenos por caracteres morfológicos

La caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos consistió en la descripción y medición de las estructuras fúngicas.

Descripción macroscópica

A partir de los aislamientos obtenidos de cada especie fúngica, se observó el tipo de borde, el aspecto y color del envés y revés de la colonia, la consistencia y se medirá el diámetro de las colonias luego de 10 días de incubación a 25 °C (Schapovaloff, 2012).

Descripción microscópica

Para la observación microscópica a partir de cultivos fúngicos, se montó en una cinta adhesiva una pequeña porción de micelio con azul de lactofenol de Amann (0,01% p/v), para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, conidióforos, células conidiógenas, (fiálides) e hifas de cada aislamiento. Para esto se utilizó un microscopio óptico.

Para la caracterización macroscópica y microscópica, la morfología observada de los hongos se comparará con los criterios propuestos por García *et al.*, (2011), Roselló (2003), Cañedo (2004) y Arias & Piñeros (2008).

Identificación molecular

Extracción ADN

La extracción de ADN se realizó con el protocolo descrito por el laboratorio de Diagnóstico molecular IDgen.

En la caja Petri que contenía el hongo se colocó 50µl de agua estéril, con la ayuda de un bisturí se obtuvo aproximadamente 1g de muestra, la cual se transfirió a un tubo de 1.5 mL y con un micropistilo correctamente esterilizado se maceró fuertemente. Luego se colocó en el tubo 3 perlas de vidrio estériles, se adicionó 500µl de buffer de extracción (2.5% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris HCl [pH 8.0]) y 2µl de β-mercaptoetanol. Se agitó la muestra vigorosamente utilizando un Vortex a velocidad máxima dos veces, hasta la pulverización del tejido. Se incubó a baño María a 60°C por 30 min, se mezcló por inversión cada 10 min. Posteriormente se añadió 500µl de cloroformo congelado, se homogenizó en Vortex por 30 segundos y se dejó reposar por unos minutos. Después se centrifugó por 14500 xg por 10 min, se tomó aproximadamente 400 µl del sobrenadante con precaución de no mezclar las fases y se colocó en un nuevo tubo de 1.5 mL. A continuación, se añadió al sobrenadante un volumen igual de etanol absoluto frío, 150µl de acetato de sodio 3M, 300µl de etanol al 70% filtrado para precipitar el ADN y se dejó reposando toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 14500 xg por 17 min y se eliminó el sobrenadante, se realizó dos lavados con aprox. 200µl de etanol al 70%, se pipeteó y descartó el etanol por inversión. Se secó el pellet durante 20 min, para esto se usó cámara de flujo laminar. Luego se resuspendió el pellet de ADN con 25µl de agua DEPC y 1µl de ARNasa, se dejó incubar por 30 min a 37°C. Finalmente el ADN extraído se almacenó a -20°C.

Cuantificación de ADN

Una vez realizada la extracción, se realizó la cuantificación de ADN en el

espectrofotómetro, el equipo primero se calibró, agregando 2 µl de agua DEPC, se realizó la lectura correspondiente, esperando que la pantalla del nanodrop marcara ingresar muestra. Ya calibrado se tomó 2 µl de ADN y se realizó la lectura correspondiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación de la región ITS1 – 5,8S – ITS2 de los hongos en estudio fue efectuada utilizando los primers específicos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) (Tabla 2) (Figura 3).

Tabla 2

Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de la región ITS1- DNAr 5,8S- ITS de hongos.

Primers	Secuencia
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

Nota. Obtenido de *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. (p.317), por T. White, T. Bruns, S. Lee & J. Taylor, 1990, In PCR Protocols: A guide to methods and applications.

Para la PCR se preparó un volumen final de 25µl, conteniendo 12,5 µl de MasterMix; 8,5 µl de agua ultrapura; 1µl de primer ITS1, 1µl de primer ITS4 y 2µl de ADN (Tabla 3). Los componentes del MasterMix son buffer (200 mM Tris- HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x concentrado); dNTP (2,5mM); MgCl₂ (50 mM) y Taq ADN polimerasa.

La mezcla de la reacción se llevó a un termociclador el cual estaba programado para 30 ciclos después de la desnaturalización inicial a 94°C por 300 seg. Cada uno de los ciclos de amplificación tuvo 3 etapas: desnaturalización a 94°C por 300 seg;

hibridación a 60°C por 60 seg y extensión a 72°C por 60 seg. Al final de los ciclos se realizó una extensión final a 72°C por 420 seg.

Después de finalizada la PCR las muestras amplificadas se analizaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% con marcador de peso molecular 100bp / 100bp Plus Opti-DNA Markers.

Tabla 3

Componentes de la reacción de amplificación.

Componentes	Cantidad (µl)
MasterMix	12,5
Agua ultrapura	8,5
Primer ITS1	1,0
Primer ITS4	1,0
ADN	2,0
Total	25,0

Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación se mandó a realizar en el laboratorio de MacroGen, Inc. ubicado en la ciudad de Seul, Corea del Sur. El procedimiento que se utilizó para la secuenciación fue el método de Sanger *et al.*, (1977). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron limpiadas y ensambladas por medio del programa bioinformático Geneious; y se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI con el uso de Blast.

Bioensayo de patogenicidad *in vitro*

Concentración del inóculo

Una vez que los hongos entomopatógenos fueron aislados e identificados

macroscópica, microscópica y molecularmente se procedió a realizar la concentración del inóculo.

Los aislamientos fúngicos fueron multiplicados en cajas Petri con medio de cultivo PDA con el objetivo de obtener conidias, se las incubó por 15 días a temperatura ambiente. Después de este periodo se preparó 3 suspensiones de cada hongo a partir de los cultivos fúngicos esporulados y se ajustó la concentración a 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias/mL, mediante la utilización de la cámara de Neubauer (Schapovaloff, 2012).

Recolección y cría de trips

Se recolectó manualmente especímenes adultos de *F. occidentalis* en cultivos de rosas de la florícola AlpaRoses S.A. ubicada en la parroquia de Conocoto, provincia de Pichincha. Para observar la presencia de la plaga se utilizó la ayuda de una lupa. Las flores recolectadas que contenían a los trips se depositaron en fundas ziploc estériles y fueron transportadas al laboratorio. Se seleccionaron trips adultos basándose en que miden 2 mm de largo, el abdomen es de color marrón a casi negro y presentan alas completamente desarrolladas. Los insectos se coloraron en recipientes de vidrio de dimensiones de 9,0 cm de diámetro x 8,0 cm de altura. Para mantener la ventilación se hizo un orificio de 6 cm de diámetro en la tapa del envase y se cubrirá con papel filtro (Wu *et al.*, 2014), para la humedad se colocó papel absorbente humedecido y fueron alimentados con flores de rosas hasta la realización de los bioensayos por un periodo no superior a las 48 horas (Schapovaloff, 2012).

La identificación morfológica de trips recolectados se basó en el trabajo realizado por (Muñoz, Suárez, & Benavides, 2008) que detalla la Caracterización taxonómica de la especie *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae).

Desinfección y preparación de flores de Rosa spp.

Para el bioensayo se recolectaron flores de los cultivos de rosas

aproximadamente de la misma edad presentes en un bloque de la empresa AlpaRoses. Para eliminar posible contaminación con otros microorganismos, se lavaron con una solución de detergente y abundante agua. Después, se remojaron con cloro al 1% durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada. Se secaron con papel toalla y se cortaron los bordes de la flor para que queden de un tamaño semejante, con una tijera desinfectada con alcohol al 70% (Espinosa, 2018).

Bioensayo dual

Para el bioensayo se utilizaron las flores de rosas desinfectadas, éstas se sumergieron por 10 s en las suspensiones de conidias con las diferentes concentraciones de los hongos en estudio, para el control se utilizó agua destilada estéril + Tween 80 (0,1%). Se escurrió el exceso de agua, se depositaron en placas Petri y se colocaron 10 trips escogidos al azar sobre las flores, con papel filtro y algodón humedecido con agua destilada para mantener la humedad. El bioensayo se mantuvo una temperatura de 25°C.

La duración de cada bioensayo fue de siete días. La mortalidad se determinó por la ausencia de movimiento de los trips al ser tocados con un hisopo estéril (Zevallos, 2013), las mediciones se realizaron diariamente y la mortalidad del tratamiento control no deberá ser mayor que 10%.

Análisis Estadístico y Diseño experimental

La mortalidad de los tratamientos fue corregida mediante la fórmula de Abbott (Cañedo & Ames, 2004):

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad control}}{100 - \% \text{ mortalidad control}}$$

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 6 tratamientos y 3 repeticiones. Se realizará 3 tratamientos de un hongo y 3 tratamientos de otro hongo con

concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 conidios/mL, más un tratamiento de control, los cuales se presentan en la Tabla 4. Cada unidad experimental constó de 10 trips colocados en una caja Petri que contiene una flor de *Rosa* spp.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con 95% de significancia, y luego un test de Tukey ($p < 0,05$) para comparar las medias entre pares de tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat software estadístico (Schapovaloff, 2012).

Tabla 4

Tratamientos en el control de trips (Frankliniella occidentalis) con los dos hongos entomopatógenos.

Tratamiento	Hongo	Concentración (conidios/mL)	# Repeticiones
T1	<i>Hongo 1</i>	10^6	3
T2	<i>Hongo 1</i>	10^7	3
T3	<i>Hongo 1</i>	10^8	3
T4	<i>Hongo 2</i>	10^6	3
T5	<i>Hongo 2</i>	10^7	3
T6	<i>Hongo 2</i>	10^8	3
Total			18

Capítulo IV: Resultados

Aislamiento e identificación morfológica de los hongos entomopatógenos

Obtención de los aislamientos

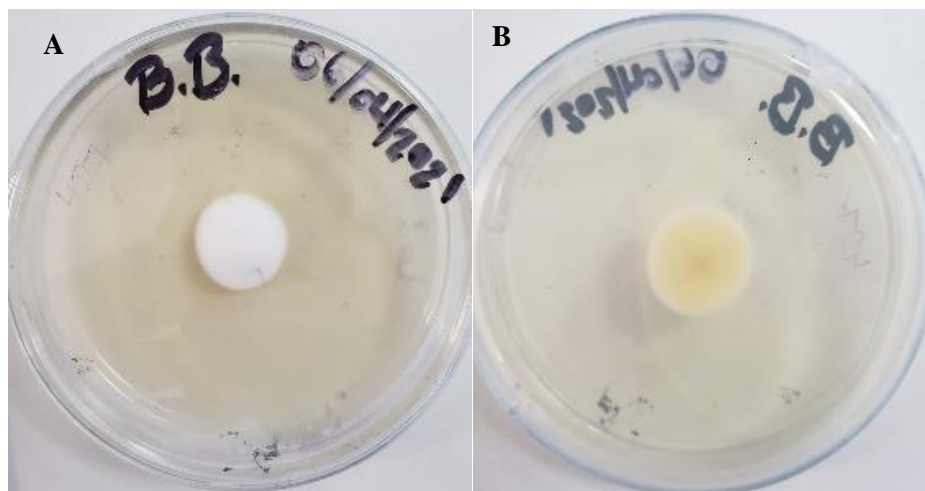
De las muestras de suelo tomadas se obtuvieron 14 aislamientos que se preseleccionaron por presentar ciertas características similares con los hongos entomopatógenos que se deseaba aislar. En el laboratorio de Microbiolab, posterior a la observación de la morfología tanto macroscópica como microscópica de los aislamientos se determinó que uno correspondía a la especie *Beauveria bassiana* y otro aislamiento a la especie *Penicillium oxalicum*.

Caracterización de Beauveria bassiana.

El aislamiento de esta especie presentó un crecimiento lento y circular, con 21 mm de diámetro en 10 días de crecimiento, su aspecto era pulverulenta, algodonosa de color blanco crema, el revés de la colonia era de color amarillento suave. En el microscopio se observaron las células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, hinchados en la base y se adelgazan hacia la punta que sostiene las conidias llamado raquis, las conidias eran hialinas y de forma globosa. El tamaño de las fiálides era de 4,1-6,2 x 1,3-1,5 μm ; el del raquis de 2,4-3,5 x 0,8-1 μm y de las conidias 2-2,9 μm de diámetro (Figura 4 y 5).

Figura 4

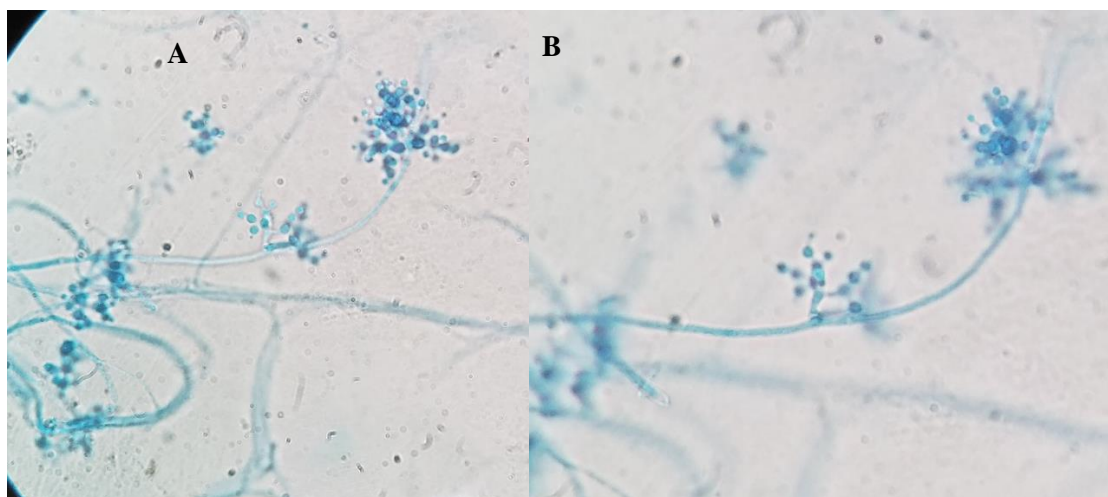
Características macroscópicas de la especie Beauveria bassiana



Nota. Aspecto y coloración de *Beauveria bassiana*. **A.** envés de la placa Petri. **B.** Revés de la placa Petri.

Figura 5

Características microscópicas de la especie Beauveria bassiana



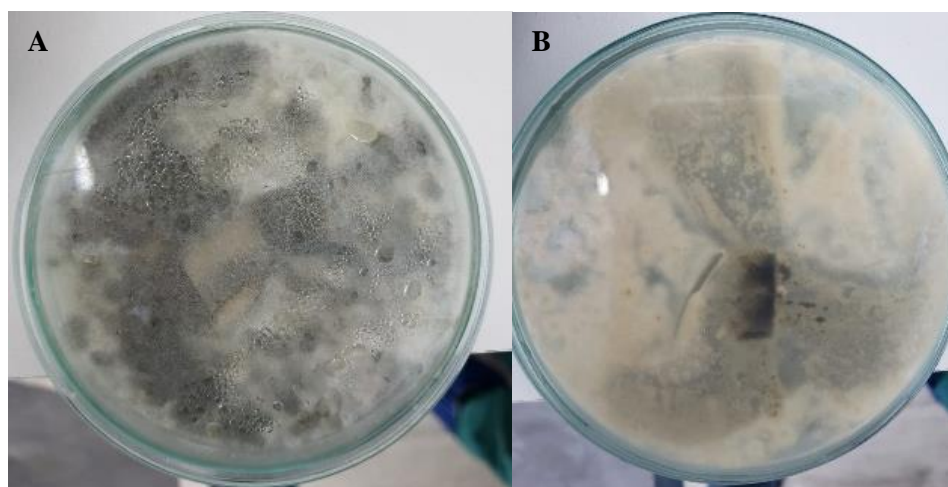
Nota. Observación al microscopio óptico 100X. **A.** Células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados con abundantes conidias. **B.** conidias globosas y subglobosas, fiálides con raquis pequeño.

Caracterización de *Penicillium oxalicum*

Esta especie presentó una coloración blanca en las orillas de la colonia y en el centro un color verde con textura pulverulenta y abundante producción de conidias. El diámetro a los 10 días de crecimiento fue de 35 mm y el revés tuvo un color amarillo (con el paso del tiempo se volvió de amarillo cremoso). Los conidióforos son hialinos cilíndricos, nacen de la superficie del micelio y tiene 2 verticilos (biverticilados). Se observó mótulas en grupos de tres con una longitud de 16-20µm. las fiálides tenía forma de botella y median 11 a 13µm. las conidias formaban cadenas largas, su forma era elíptica y con un diámetro de 3 a 4,8 µm (Figura 6 y 7).

Figura 6

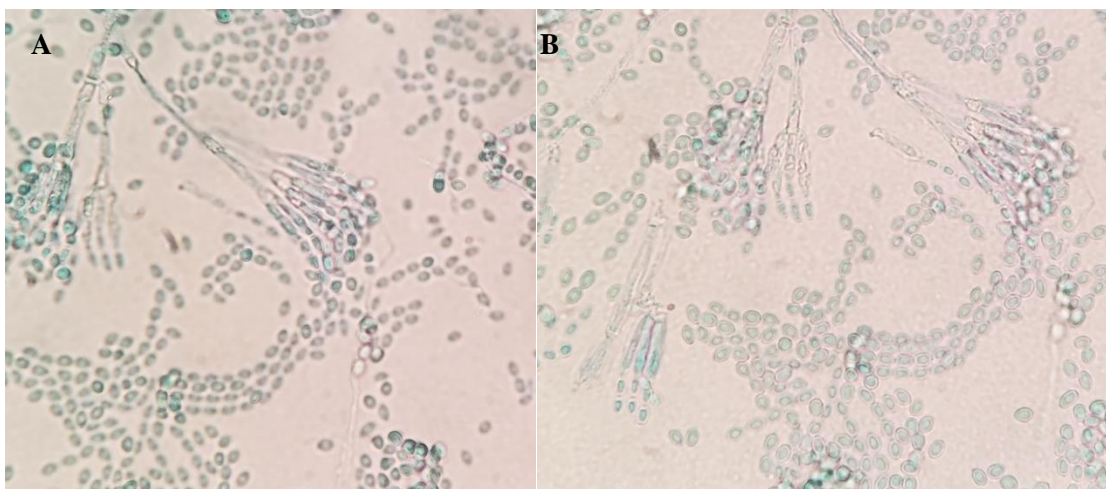
*Características macroscópicas de la especie *Penicillium oxalicum**



Nota. **A.** Aspecto y coloración de *Penicillium oxalicum*. **A.** envés de la placa Petri. **B.** Revés de la placa Petri.

Figura 7

Características macroscópicas de la especie *Penicillium oxalicum*



Nota. Observación al microscopio óptico 100X **A.** conidióforo hialino biverticilado, métulas en grupos de tres y fiálides en forma de botella. **B.** conidias elípticas y en cadenas largas.

Identificación molecular de los hongos entomopatógenos

Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN las muestras de las especies *B. Bassiana* y *P. oxalicum* se nombraron como BBM1 y POM1 respectivamente. En la tabla 5 se presenta el resultado de la cuantificación de las muestras de ADN. Se observa la concentración de ADN y los parámetros como A260/280 y A260/230 que nos indican la calidad del ADN obtenido.

Tabla 5

Valores obtenidos del proceso de cuantificación de las muestras de ADN

#	ID muestra	Ácido nucleico	Unidad	A260 (Abs)	A280 (Abs)	A260/280	A260/230	Tipo de muestra
1	BB M1	966,7	ng/μl	19,334	9,796	1,97	1,43	DNA
2	POM1	1385,1	ng/μl	8,215	4,527	1,93	1,22	DNA

Nota. BBM1 = muestras de *B. bassiana*, POM1 = Muestra de *P. oxalicum*

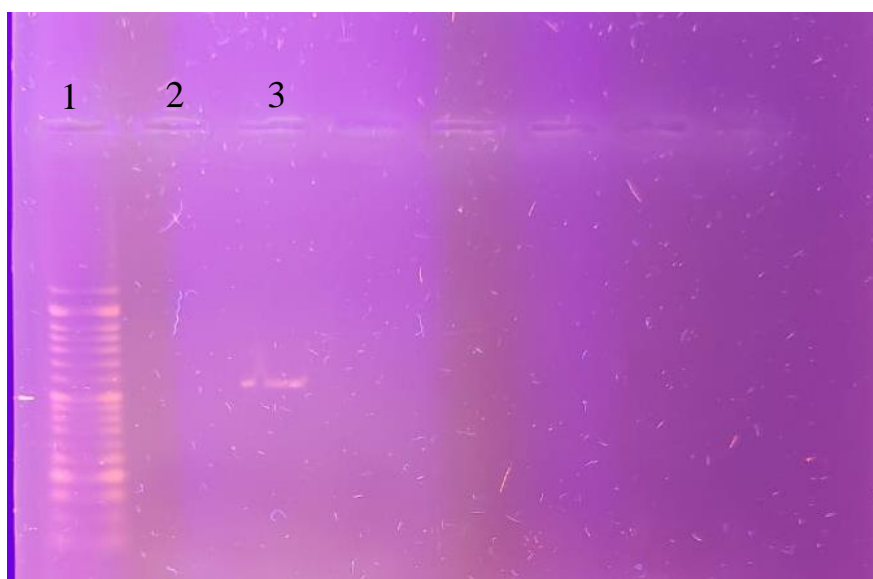
Reacción en cadena de la polimerasa – PCR

Los dos aislamientos fúngicos obtenidos fueron identificados mediante una caracterización macroscópica y microscópica; sin embargo, para ratificar la identificación se realizó un análisis por una técnica molecular, en este caso la PCR. La amplificación de la región ITS1 – 5,8S – ITS2 fue realizada para confirmar las dos especies en estudio.

Los amplicones obtenidos al realizar la PCR con los primers ITS1 e ITS4 se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Se puede observar en la Figura 8 que la muestra BBM1 (correspondiente al aislamiento de *B. Bassiana*) presenta una banda de aproximadamente 550 bp, mientras que para la muestra POM1 (correspondiente al aislamiento de *Penicillium oxalicum*) se evidencia en el gel un amplicón claro cercano a los 600bp (Figura 9). En los dos casos el blanco no tuvo presencia de banda lo que nos indica que no hay contaminación y el proceso de PCR fue válido.

Figura 8

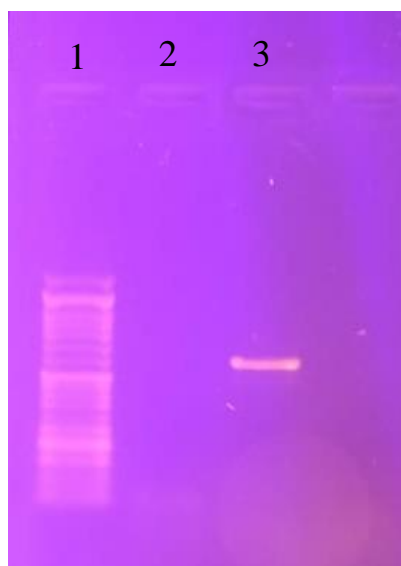
PCR del aislamiento fúngico B. bassiana



Nota. Electroforesis del amplicón de *B. bassiana* en gel de agarosa al 1% **1.** Marcador de peso molecular 100bp / 100bp Plus Opti-DNA Markers. **2.** Blanco. **3.** Muestra BBM1.

Figura 9

PCR del aislamiento fúngico P. oxalicum



Nota. Electroforesis del amplicón de *P. oxalicum* en gel de agarosa al 1% **1.** Marcador de peso molecular 100bp / 100bp Plus Opti-DNA Markers. **2.** Blanco. **3.** Muestra POM1.

Secuenciación y análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas de la región ITS1 – 5,8S – ITS2 de los dos hongos se compararon con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI. Los resultados que se observan en la Tabla 6 mostraron que la muestra BBM1 presenta un 99,62% de identidad con la especie *Beauveria Bassiana*, mientras que la muestra POM1 mostró un 99,14% de identidad con las secuencias de varios aislamientos de *Penicillium oxalicum* (Gen Bank no. acceso HE651152, NR_121232, AF033438)

Tabla 6

Identidad de los aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo de cultivos de rosas basado en la amplificación del espacio interno ITS de la región del DNA ribosomal, según BLAST en NCBI.

Nombre de la cepa	Cobertura	Valor de E	% de identidad	Especie
BBM1	100%	0,0	99,62	<i>Beauveria Bassiana</i>
POM1	99%	0,0	99,14%	<i>Penicillium oxalicum</i>

Nota. BBM1=aislamiento de *B. bassiana*, POM1=aislamiento de *P. oxalicum*

Bioensayo de patogenicidad *in vitro*

Identificación morfológica de F. occidentalis “Trips”

Adulto: En la figura 10 se observa que *F. occidentalis* tiene tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza se encuentran las antenas, el triángulo ocelar y dos ojos grandes; en el tórax presenta dos pares de alas, 3 pares de patas y, en el abdomen se muestran ocho tergitos.

Figura 10

Caracterización morfológica de un adulto de Frankliniella occidentalis



Cabeza: Se observó que la cabeza es más ancha que larga, los ojos son voluminosos, tiene tres pares de setas ocelares, el par III es largo y se encuentra dentro del triángulo ocelar y los dos pares de setas anteriores son cortas. El cuarto par de setas postoculares es más largo que la distancia entre los ocelos posteriores y con frecuencia casi tan largo como el tercer par de setas (Figura 11).

Figura 11

Caracterización de la cabeza de Frankliniella occidentalis.



Antenas: Se observó que *F. occidentalis* tiene dos antenas que están formadas por ocho artejos, los dos últimos son pequeños y producen una especie de estilo con el VI. Los segmentos II, VI, VII y VIII son pardos oscuros, el segmento I es más claro que los demás. El segmento III, IV y V tienen sombreada la parte apical y la base clara. Los

segmentos III y IV se observaron que tenían la base es gruesa, rodeada de cuatro setas cada una (Figura 12).

Figura 12

Caracterización de las antenas de Frankliniella occidentalis.



Alas: En la figura 13 se observa que esta especie tiene 4 alas angostas con flecos en sus bordes posteriores. Las alas son alargadas y tienen un color transparente, la nervadura principal del ala anterior tiene una línea continua en la cual se observan 22 setas oscuras, y sobre la nervadura del ala posterior 15 setas.

Figura 13

Caracterización de las alas de Frankliniella occidentalis.



Patas: Se observó que *Frankliniella occidentalis* tiene 3 pares de patas, las cuales son amarillas claras y los tarsos están formados por dos segmentos (Figura 14).

Figura 14

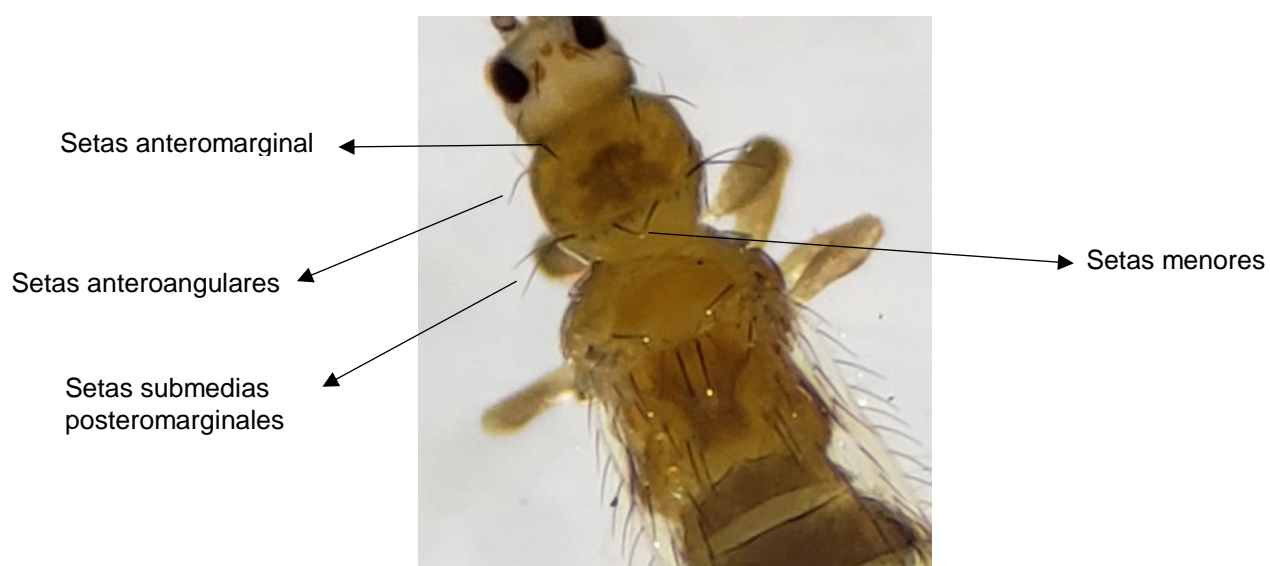
Caracterización de las patas de Frankliniella occidentalis.



Chaetotaxia en Pronoto y Metanoto: En la figura 15 se observó que esta especie tiene setas pronotales anteroangulares que son de similar tamaño como las anteromarginales, un par de setas menores se notan medialmente entre las setas submedias posteromarginales. El metanoto tiene 2 pares de setas en el margen anterior y se observa una retícula en el centro con un par de sensores campaniforme.

Figura 15

Chaetotaxia en Pronoto y Metanoto de Frankliniella occidentalis.



Abdomen: se observó ctenidias en los segmentos abdominales del V al VIII, en el segmento VIII esta ctenidias se sitúa anterior al espiráculo. En el tergito VIII se observa un peine completo sobre las bases anchas y también sobre las bases amplias. Los segmento o tergitos son pálidos y de color oscuro (Figura 16).

Figura 16

Morfología de los segmentos del abdomen de Frankliniella occidentalis

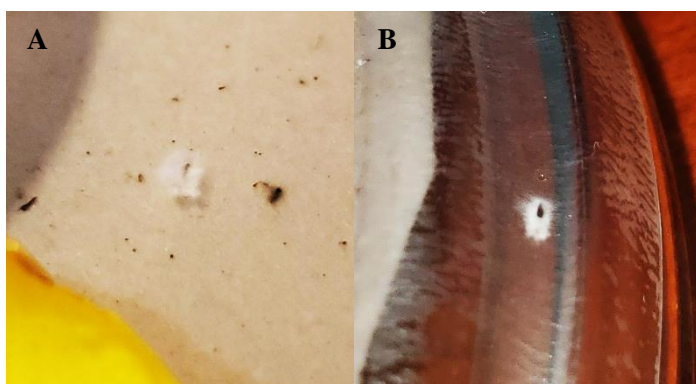


Bioensayo dual

El bioensayo realizado durante un periodo de siete días mostró que *B. Bassiana* y *P. oxalicum* presentan un efecto antagonista en la plaga *F. occidentalis* "trips", ya que en cada uno de los tratamientos se evidenció un ataque del hongo hacia el insecto. En la Figura 18 se muestra la acción de los hongos sobre la plaga de trips.

Figura 17

Acción de los hongos en estudio sobre Frankliniella occidentalis a nivel de laboratorio.



Nota. Se observa al hongo momificando al insecto. **A.** *P. oxalicum*. **B.** *B. Bassiana*.

El registro del porcentaje promedio de mortalidad de los adultos de *F. occidentalis* tratados con los hongos entomopatógenos con concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias/mL, nos dio como resultado que el tratamiento con la mortalidad más alta fue el correspondiente a *B. Bassiana* con una concentración de 10^8 conidias/mL; y, por el contrario, el que tuvo el porcentaje más bajo de mortalidad fue *P. oxalicum* con 10^6 conidias/mL (Tabla 7). De acuerdo al análisis estadístico, se observó que al aumentar la concentración del tratamiento, este produce un mayor porcentaje de mortalidad de trips, este hecho se evidenció para los dos hongos en estudio ya que a mayor concentración, hubo mayor mortalidad (Figura 18). También se observó que *B. Bassiana* independientemente de la concentración utilizada produjo una mayor mortalidad en la plaga que el hongo *P. oxalicum*, como se puede ver en la Figura 19 los porcentajes de mortalidad son 56,79% y 40,74 respectivamente. Por último en la Tabla 7 se observa que los tratamientos de *B. bassiana* a una concentración de 10^7 y 10^8 conidias/mL y los de *P. oxalicum* a 10^8 conidias/mL presentan una efectividad alta y estadísticamente son significativamente diferente al resto de tratamientos que mostraron una mortalidad inferior al 30%.

Tabla 7

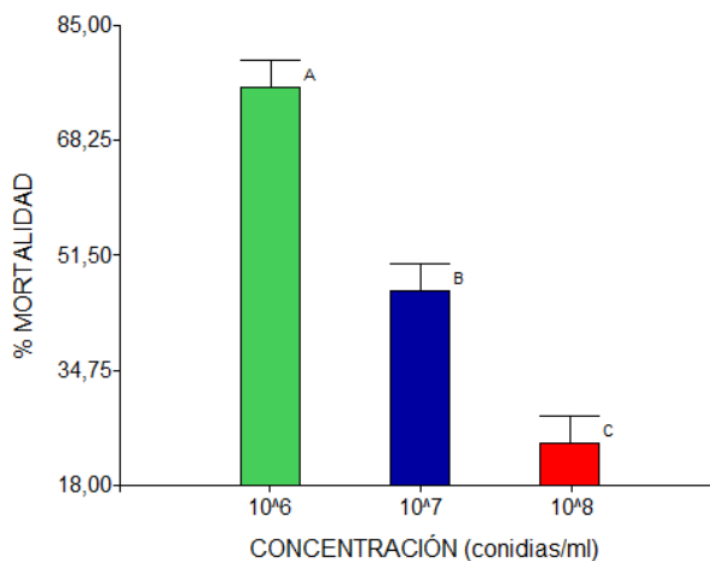
Porcentajes promedio de mortalidad de *F. occidentalis*, expuestas a diferentes concentraciones de *B. bassiana* y *P. oxalicum* en condiciones de laboratorio.

Hongo	Concentración (conidios/mL)	Mortalidad corregida (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	10^6	29,63 ^b
	10^7	62,97 ^a
	10^8	77,78 ^a
<i>Penicillium oxalicum</i>	10^6	18,52 ^b
	10^7	29,63 ^b
	10^8	74,08 ^a

Nota. * = Distintas letras en las medias de mortalidad indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). EE= error estándar.

Figura 18

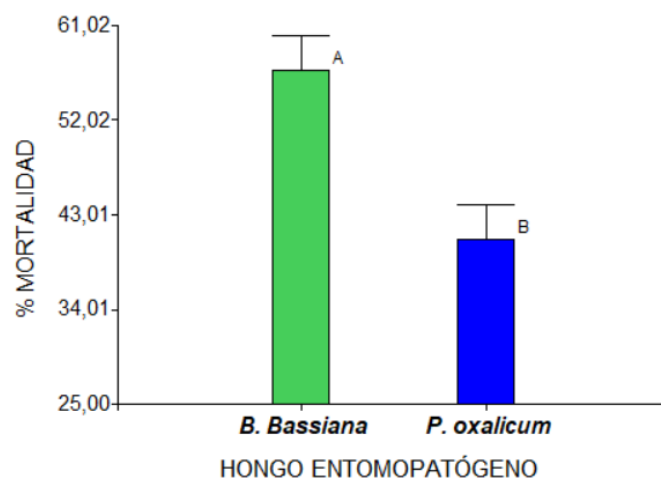
Porcentajes promedio de mortalidad de *F. occidentalis* según la concentración utilizada.



Nota. * = Distintas letras en las medias de mortalidad indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). EE= error estándar.

Figura 19

Porcentajes promedio de mortalidad de *F. occidentalis* según el hongo utilizado.



Nota. * = Distintas letras en las medias de mortalidad indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). EE= error estándar.

Capítulo V: Discusión

En este proyecto de investigación se consiguió aislar la especie *Beauveria bassiana* de muestras de suelo de cultivos de rosas; Doberski & Tribu (1980) mencionan que los hongos entomopatógenos pueden vivir en el suelo e infectar a los insectos, el género *Beauveria* fue identificado en diferentes suelos de varios ambientes y fue aislado en medios de cultivo microbiológicos. Diversos estudios indican haber aislado del suelo varias especies de hongos entomopatógenos como *P. lilacinum*, *M. anisopliae*, y *B. bassiana*, recalcando que son los más comunes en muestras suelo (Schapovaloff et al., 2015; Sun et al., 2008). No fueron aisladas las otras especies que se pretendía obtener, debido posiblemente a factores como la temperatura que oscila entre 8°C - 26°C y la humedad relativa que en promedio es de 76%, en la parroquia de Conocoto, ya que hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* y *L. lecanii* tienen un desarrollo óptimo a temperaturas de 27°C y alrededor de 90% de humedad relativa (Berlanga & Hernández, 2002; Vargas, 2017). En este estudio se aisló a *B. bassiana* lo que se corresponde con lo mencionado por Meyling & Eilenberg (2006), que este hongo entomopatógeno tiene una mayor tolerancia a cambios de las condiciones ambientales que otros hongos, demostrando ser una especie común en variedad de hábitats.

Las características morfológicas del aislamiento fúngico de *B. Bassiana*, con respecto al diámetro de la colonia (21 mm) coincide con lo descrito por Domsch et al., (1993) ya que establece un rango de crecimiento de 0,6 a 2,3 cm de diámetro en 10 días. El aspecto, la coloración de la colonia, la morfología de las conidias, conidióforos, y células conidiógenas tienen concordancia con estudios que describen la identificación morfológicas de hongos entomopatógenos entre ellos *B. Bassiana* (García et al., 2011; Cañedo & Ames, 2004).

También se obtuvo un aislamiento de *P. oxalicum*, su caracterización mostró que el aspecto y la coloración fue idéntico a lo descrito por Allende et al., (2013) pero el

diámetro de la colonia fue ligeramente mayor en nuestro aislamiento obtenido. Arias & Piñeros (2008) mencionan que las conidias de *P. oxalicum* están en un rango de 3,2 a 5.0 μm lo que concuerda con nuestro estudio ya que el tamaño de las conidias estaban en dicho rango, de igual manera coincidían las características de los conidióforos, mótulas y fiálides.

Para evaluar la pureza relativa y la concentración de una muestra de ADN por espectrofotometría se utiliza las longitudes de onda a 260 nm, 280 nm y 230 nm (Gallou *et al.*, 2015). Las proteínas absorben luz UV a 280 nm y sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos a 230 nm, de modo que la relación A260/280 considera que un ADN es de pureza óptima si tiene un valor entre 1,8 -2,0; y la relación A260/230 considera a un ADN puro con un valor de 1,8 – 2,2 y un ADN altamente contaminado <1,5 (Banco Nacional de ADN, 2020); en nuestro estudio los valores de A260/280 estaban en el rango de pureza óptima y los valores de A260/230 mostraban un ADN altamente contaminado. A pesar de este inconveniente los ADN obtenidos se consideraron de buena calidad y se usaron en el proceso de PCR obteniendo buenos resultados.

Tradicionalmente, la identificación de especies de hongos entomopatógenos aislados de diferentes ambientes naturales, estaba basado en métodos como la caracterización morfológica o la bioquímica (Echeverría, 2006). Sin embargo Glare *et al.*, (1996), encontraron que la estructura morfológica de las fiálides de un solo aislamiento de un hongo entomopatógeno (*M. anisopliae*) podía cambiar dentro de la misma colonia, y también, con la utilización de diversos sustratos. Adicionalmente, recalcaron que el único carácter morfológico que servía para la identificación son las conidias, pero para *M. anisopliae* ni ese carácter resultaba 100% efectivo. Por tal motivo es de mucha importancia el uso de técnicas moleculares en la identificación, ya que en el manejo integrado de plagas es clave diferenciar las especies de hongos entomopatógenos con exactitud. Con base a este criterio, en este trabajo de

investigación se realizó un análisis molecular con la técnica de PCR para amplificar la región ITS1, 5,8S y el ITS2 que es utilizada para identificar especies fúngicas. Los resultados obtenidos son similares a los descritos por Allende *et al.*, (2013); Cruz & Del Rincón (2016) quienes utilizaron los primers ITS1 e ITS4 y obtuvieron amplicones de aproximadamente 600 pb para las especies *B. bassiana* y *P. oxalicum*. La secuenciación permitió comparar las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI, en donde se confirmó la identidad taxonómica de las especies analizadas.

Según Salazar, (2019) la crianza masiva de trips tiene resultados considerablemente buenos con el uso de botes de plástico de 10 cm de altura y 5 cm de diámetro con agujeros en la tapa y a los lados del bote con mallas antitrips, con la fuente de alimentación de vainas de *Phaseolus vulgaris*, y el uso de una cámara con control del fotoperiodo y temperatura de 16:8 y 22-26°C respectivamente. En este estudio se optó por realizar lo recomendado por Schapovaloff (2012) que es recolectar los especímenes de *F. occidentalis* por las características que distinguen a los adultos y mantenerlos en un periodo no mayor a las 48 horas antes del bioensayo. Por otro lado, los resultados obtenidos en la identificación morfológica de los trips coincidieron con el estudio de realizado por Muñoz, Suárez & Benavides (2008), quienes describen la caracterización taxonómica de la especie *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), plaga del cultivo de rosas.

Los bioensayos llevados a cabo en condiciones laboratorio con un aislamiento de *B. Bassiana* y uno de *P. oxalicum* demostraron que presentaban antagonismo sobre la plaga *F. occidentalis* que afecta a cultivos de rosas. El porcentaje de mortalidad de los tratamientos con estos hongos varió de 18,52% a 77,78%. El tratamiento de *P. oxalicum* con una concentración de 10^8 conidias/mL junto con los tratamientos de *B. Bassiana* a 10^7 y 10^8 conidias/mL fueron más efectivos y significativamente diferentes al resto de tratamientos que tuvieron porcentajes de mortalidad por debajo del 30%. Hafez

et al., (1994) señala que la germinación, penetración del tubo germinativo y posteriormente el desarrollo del hongo sobre el insecto se debe principalmente al contacto entre el inóculo de un hongo virulento y la susceptibilidad de la cutícula del insecto. Fue notorio que la mortalidad aumento en proporción a la concentración de conidias/mL presentes en cada tratamiento, es decir, a mayor concentración mayor mortalidad. Los porcentajes obtenidos fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$), esta afirmación coincide con el estudio realizado por Storey & Gardner (1988) que confirmaron lo antes mencionado.

Estadísticamente el aislamiento de *B. bassiana* es significativamente más virulento que el aislamiento de *P. oxalicum*, esto puede ser debido a que *B. bassiana* produce una variedad de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales están involucradas en la penetración, infección y expresión del hongo en el insecto; un ejemplo es la beauvericina, una micotoxina, que tiene actividades insecticidas (Wang & Xu, 2012). Diversos estudios han corroborado la eficacia de *B. bassiana* sobre diversas plagas, es así que Torres *et al.*, (2016) reportó que aislamientos de *B. bassiana* tienen un antagonismo sobre la plaga *H. hampei* (broca del café) con una efectividad patogénica fue del 100% a las 144 h; Villegas *et al.*, (2017) informó que diversos aislados de *B. bassiana* tuvieron una mortalidad que fluctuó entre 90 a 100% con las concentraciones de 10^7 y 10^8 conidias/mL sobre ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli*, también se ha reportado el control biológico de *F. occidentalis* en cultivos de espárragos con *B. bassiana* siendo la mortalidad más alta del 64,8% a los ocho días después del tratamiento.

En este estudio se pone a prueba por primera vez a *P. oxalicum* como un hongo entomopatógeno de la plaga de *F. occidentalis* "Trips". Prácticamente, existe muy poca información del hongo *P. oxalicum* usado como controlador biológico de plagas. Kumar *et al.*, (2018), reportaron a *P. oxalicum* como un posible nuevo hongo entomopatógeno

debido a que lo aislaron de una mosca blanca momificada por el mismo; mostraron además, el crecimiento de las hifas fúngicas en la cavidad corporal de la mosca blanca y también que los cadáveres momificados estaban completamente descompuestos con solo sus alas en los escombros, posiblemente debido a la producción y secreción de enzimas hidrolíticas del hongo. Michereff *et al.*, (1995), informó que *P. oxalicum* es un hongo patógeno del pulgón *Ceratovacuna lanigera*, una plaga de insectos en la caña de azúcar y Al-Keridis (2015) descubrió el efecto de *Penicillium* sp. para controlar el escarabajo rojo (*Tribolium castaneum*) mediante el uso de diferentes concentraciones de extracto del hongo, siendo la más efectiva la concentración al 50%. Esta investigación mostró que *P. oxalicum* tiene antagonismo contra la plaga *F. occidentalis* pero se debe seguir estudiando este hongo para corroborar estos resultados obtenidos, además continuar probando la actividad patogénica del hongo con diferentes plagas de diversos cultivos y así en un futuro poder usarlo como un producto para el control biológico.

Capítulo VI: Conclusiones

Se obtuvieron dos hongos entomopatógenos correspondientes a las especies de *Beauveria bassiana* y *Penicillium oxalicum*.

La caracterización morfológica de los aspectos macroscópicos y microscópicos posibilitó la identificación de los hongos entomopatógenos y el análisis molecular confirmó la identidad de las especies *Beauveria bassiana* y *Penicillium oxalicum*.

Se identificó morfológicamente a la especie *Frankliniella occidentalis*, y se la recolectó 48 horas antes de los bioensayos.

La hipótesis de investigación se acepta debido a que *Beauveria bassiana* y *Penicillium oxalicum* mostraron antagonismo frente a la plaga *Frankliniella occidentalis* a nivel de laboratorio, con mortalidad de los insectos.

El tratamiento de *B. bassiana* a la concentración de 10^8 conidias/mL fue la más efectiva con un 77,78 % de mortalidad.

Se reporta a *Penicillium oxalicum* como posible controlador de la plaga *F. occidentalis* presente en cultivos de rosas, sin antecedentes previos encontrados en bibliografía.

Capítulo VII: Recomendaciones

Continuar con la investigación de *Beauveria bassiana* y *Penicillium oxalicum* para verificar su antagonismo sobre *Frankliniella occidentalis* a nivel de invernadero y de campo en los cultivos de rosas.

Bibliografía

- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y Purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*, 1-26.
- Allende, R., Picos, P., Márquez, I., Carrillo, J., García, R., & León, J. (2013). Identificación Morfológica y Molecular de *Penicillium oxalicum* Causante de Pudrición de Tallos y Frutos de Tomate. *Revista mexicana de fitopatología*, 13-19.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Repositorio de la producción intelectual de la Pontificia Universidad Javeriana*. Obtenido de Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de paramos de Guasca y Cruz verde: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Avalos, A. M., & Castro, M. C. (2016). Aislamiento e identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos con actividad hacia el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Entomología mexicana*, 3, 197-202.
- Banco Nacional de ADN*. (2020). Obtenido de Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN: <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Becerra, V., Paredes, M., Rojo, C., & France, A. (2006). RAPD e ITS Detectan Variación Molecular en Poblaciones Chilena de *Beauveria bassiana*. *Agricultura Técnica*, 67(2), 115-125. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072007000200001>
- Berlanga, A., & Hernández, V. (2002). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M. a. var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 51-55.

- Bonilla, M. (ResearchGate de 2012). *Inoculación y establecimiento endofítico de cepas de los hongos entomopatógenos Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y Lecanicillium lecanii en plantas de fríjol (Phaseolus vulgaris)*.
doi:10.13140/RG.2.2.13603.66083
- Boucias, D., Tigano, M., Sosa-Gomez, D., Glare, T., & WInglis, P. (2000). Genotypic Properties of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi*. *Biological Control*, 124-138. doi:<https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0857>
- Bustillo, A. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. *Sociedad Colombiana de Entomología*, 30-53.
- Campos, J. C., Carvajal-Cazóla, C., Ulloa-Rubio, K., Velasco, C. R., Reyes, D. B., Bermúdez, A. R., & Ortega, C. S. (2012). Entomófagos y efectividad de hongos entomopatógenos en *Gynaikothrips uzeli* (Thysanoptera: Phlaeothripidae) en *Ficus benjamina* (Moraceae)*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 765-770.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Obtenido de Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos:
<http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- CAÑEDO, V., & AMES, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú. Obtenido de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Cardenas, E., & Corredor, D. (1989). Biología del Trips *Frankliniella Occidentalis* (Pegande) (Thysanoptera: thripidae) sobre Crisantemo *Chrysanthemum morifolium* l. bajo condiciones de laboratorio. *Agronomía Colombiana*, VI, 177.
- Cluever, J. D., & Smith, H. A. (2017). A Photo-Based Key of Thrips (Thysanoptera) Associated with Horticultural Crops in Florida. *Florida Entomologist*, 456-467.
doi:<https://doi.org/10.1653/024.100.0208>
- Cuzco, A. G. (2013). *Sistematización del manejo integrado de Frankliniella occidentalis*,

en el cultivo de rosas bajo invernadero en el sector de Tabacundo, Cantón Pedro Moncayo Provincia de Pichincha. Obtenido de Universidad Politécnica

Salesiana:

<https://revistasdigitales.upec.edu.ec/index.php/sathiri/article/view/274/1688>

Doberski, J., & Tribe, H. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *beauveria bassiana* and *metarhizium anisopliae*.

Transactions of the British Mycological Society, 74(1), 95-100.

doi:[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80013-1)

Echeverría, F. (2006). *Repositorio del Instituto Tecnológico de Costa Rica*. Obtenido de

Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo

entomopatígeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin :

<https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/463/Trabajo%20Final%20de%20Graduacion%20Biblioteca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ekesi, S., Maniana, N., Ampong-Nyarko, K., & I. Onu. (2002). Potential of the

entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin for control

of the legume flower thrips, *Megalurothrips sjostedti* (Trybom) on cowpea in

Kenya. *ELSEVIER*, 661-668. doi:[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(98\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00069-6)

Espinosa, P., Fuentes, J., Contreras, J., Bielza, P., & Lacasa, A. (2002). Método de cría

en masa de *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Boletín de sanidad vegetal*.

Plagas, 28, 385-390.

Espinosa, T. L. (2018). *Control de Aphis citrudis (kirk.) (Hemiptera: Aphididae) por*

medio del uso de Beauveria bassiana (Bals.) Vuilli. (Hypocreales:

Cordycipitaceae) en condiciones de laboratorio. Obtenido de Cuidad

Universitaria Rodrigo Facio:

<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/5990>

Fainstein, R. (2003). *Abya Yala*. 28. Obtenido de Manual para el control de plagas y

enfermedades en cultivos.

Gallou, A., Suaste, A. P., Serna, M., & Andrade, G. (2015). *Manual de prácticas del laboratorio de biología molecular*. Diseño Editorial.

García García, M. A., Cappello García, S., & Leshner Gordillo, J. M. (Villahermosa, México de 2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10 (2), 21-28.

Glare, T., Milner, R., & Beaton, C. (1996). Variation in *Metarhizium*, a Genus of Fungal Pathogens Attacking Orthoptera: Is Phialide Morphology A Useful Taxonomic Criterion? *Journal of Orthoptera Research*(5), 19-27.

doi:<https://doi.org/10.2307/3503572>

Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Senasa*. Obtenido de Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos:

<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Produccion-y-Uso-de-Hongos-Entomopatogenos.pdf>

González, G., Venegas, C., González, O., Vargas, H., Jiménez, M., Pérez, E., & Azuara, A. (2019). Abundancia y distribución de hongos entomopatógenos en diferentes localidades y ambientes del sur de Tamaulipas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(3), 669-681. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1550>

Guagalango, T. R. (2020). *Repositorio Digital - Universidad Central del Ecuador*.

Obtenido de Evaluación de la aplicación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de trips (*Frankliniella occidentalis*) en rosas:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21410/1/T-UCE-0004-CAG-243.pdf>

Hafez, M., Zaki, F., Moursy, A., & Sabbour, M. (1994). Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the Potato tuber moth

- Pthorimaea operculella* (Seller). *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 7(4).
- Hernández, M. d., Martínez, J. F., & Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 4-32.
doi:<https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Herrera, C. (2013). Análisis del control biológico de Trips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) (Pergande) en el cultivo de rosas *Rosa* spp del Ecuador. *SATHIRI*, 5, 46-56.
- Infoagro. (2009). Obtenido de El cultivo de las rosas para corte:
<https://www.infoagro.com/flores/flores/rosas.htm>
- Inglis, P., & Tigano, M. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 132-136. doi:<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100025>
- Intagri . (2016). Obtenido de *Beauveria bassiana* en el Control Biológico de Patógenos:
<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
- Intagri. (2016). *Beauveria bassiana* en el Control Biológico de Patógenos. Consultado el 23 de . Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
- Jiménez, E. (2009). *Centro Nacional de Información y Documentación Agropecuaria - Universidad Nacional Agraria (UNA)* . Obtenido de “Métodos de Control de Plagas”: <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10J61me.pdf>
- Kumar, S., Singh, P., Pandove, G., Kalia, A., & Ravinder. (2018). *Penicillium oxalicum* spg1: A novel entomopathogenic fungus isolated from mummified *Bemisia tabaci* (Gennadius) of cotton. *Journal of Applied and Natural Science*, 138 - 143.

- Lino, B., Contreras, G., Lacasta, P., & Sánchez, S. (1998). *Orden Thysanoptera*. 509-512. In: *Entomología agroforestal (Insectos y ácaros que dañan montes, cultivos y jardines)*. De Liñán C. V. (ed.) . Ciudad de México: Ediciones Agrotécnicas S. L. México, 1309 p. .
- Liñan, C. (1998). *Entomología Agroforestal*. Madrid: Ediciones Agrotécnicas S.L. Madrid.
- Meyling, N., & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1-4), 336-341.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.10.011>
- Montilla, D. (2013). *Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Trujillo*.
Obtenido de Efecto de la concentración de clopirifos sobre la germinacion y crecimiento de *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea* en condiciones de laboratorio:
<https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3897/Montilla%20Garcia,%20Dolibeth.pdf.pdf?sequence=1>
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 77-90. doi:(<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.187>)
- Muñoz, C. L. (2018). *Cultivos de rosas en el Ecuador*. Obtenido de efi:
<http://puceae.puce.edu.ec/efi/index.php/economia-internacional/14-competitividad/177-cultivos-de-rosas-en-el-ecuador>
- Muñoz, C., Suárez, L. F., & Benavides, M. A. (2008). Caracterización taxonómica de la especie *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), plaga del cultivo de rosa para exportación. *Inventum*, 4, 89-93.
- Pardey, A. E. (2009). Evaluación de insecticidas químicos y biológicos para controlar *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) en cultivos de espárragos.

Revista Colombiana de Entomología, 12-17.

- Perez, D. J. (2015). *Alternativas de control biológico para thrips (Frankliniella occidentalis) (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) en el cultivo de rosa (Rosa sp.)*. Obtenido de Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/3467/35355300.pdf;jsessionid=DB8F35DAFD5753124BEE9B53F51ED573.jvm1?sequence=1>
- Perkins. (2018). *Metarhizium anisopliae*. Obtenido de Productos biológicos - PERKINS Ltda.: <http://perkinslda.com.co/services/metarhizium-anisopliae/>
- Plasencia, A. L. (1990). Datos sobre taxonomía, biología y comportamiento de *Frankliniella*. *PHYTOMA*, CU6.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & Torre, M. d. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856 - 860.
- Pujota, A. (2013). *DSpace*. Obtenido de Sistematización del manejo integrado de *Frankliniella occidentalis*, en el cultivo de rosas bajo invernadero en el sector de tabacundo, cantón Pedro Moncayo Provincia de Pichincha.: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5076/6/UPS-YT00253.pdf>
- Reitz, S. (2020). *Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC)*. Obtenido de Invasive Species Compendium: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24426#tosummaryOfInvasiveness>
- Rodríguez, F. V., Gómez, O. D., Flores, J. S., Vargas, C. T., & Mejía, F. T. (2017). Actividad de dos hongos entomopatógenos, identificados molecularmente, sobre *Bactericera cockerelli*. *Revista Colombiana de Entomología*, 27-33.
- Rodríguez, G. A., Arrieta, J. A., Muñoz, C. G., Campos, J. C., & Salazar, A. P. (2017). Clave para la identificación de géneros de Thrips (Insecta: Thysanoptera) comúnmente asociados a plantas ornamentales en centroamérica. *Acta Zoológica Mexicana*.

- Rodríguez, M. (1993). *Manejo y control de plagas de insectos*. (Vol. 3). Ciudad de México: Limusa.
- Rojas, T. (2006). Los hongos entomopatógenos: Aliados del Agricultor. *CENIAP HOY*, 2.
- Roselló, J. (2003). *RiuNet - Repositorio Institucional de la Universitat Politècnica de València*. Obtenido de Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. : <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2905/tesisUPV1934.pdf>
- SALAZAR, L. (2019). *Universidad de los Llanos - Repositorio Digital*. Obtenido de Cría masiva de trips fitófagos asociados con el cultivo de aguacate en michoacán, México: <https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/handle/001/1411/Cria%20Masiva%20de%20Trips%20Fit%F3fagos%20Asociados%20con%20el%20Cultivo....pdf;jsessionid=C33BB52314FBFE5E5E67308D2B803F56?sequence=1>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schapovaloff, M. (2012). *Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones*. Obtenido de Universidad Nacional de la Plata: <https://core.ac.uk/download/pdf/296351981.pdf>
- Schapovaloff, M., Angeli, L., Urrutia, M., & López, C. (2015). Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina Natural occurrence of entomopathogenic fungi in soils cultivated with Paraguay tea (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) in Misio. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 138-142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.005>

- Sharma, L., Bohra, N., Rajput, V., Quiroz, F., Singh, R., & Marques, G. (2020). Advances in Entomopathogen Isolation: A Case of Bacteria and Fungi. *microorganisms*, 9(1), 1-28. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>
- Steinhaus, E. (1985). Microbial Diseases of Insects. *Annual Review of Microbiology*, 11, 165-182. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.11.100157.001121>
- Sun, B.-D., Yu, H.-y., Chen, A., & Liu, X.-Z. (2008). Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*, 27(11), 1421-1426. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.010>
- Tanada, Y., & Kaya, H. (1993). *Insect Pathology*. San Diego: Ademic Press.
- Téllez, A., Cruz, M., Mercado, Y., Asaff, A., & Arana, A. (2009). Scielo. Obtenido de Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a7.pdf>
- Torres, J. D., Torres-de-la-Cruz, M., Cruz, M. P., Cruz-Pérez, A. D., & García, C. F. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42, 28-35.
- Torres, M., Cortez, H., Ortiz, C., Cappello, S., & Cruz, A. d. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología*, 40-46.
- USDA. (2010). *Sistema de regulación, inspección y procedimientos para la importación de flores del Ecuador*.
- Vargas, D. (2017). *Repositorio del SIBDI - UCR*. Obtenido de Efecto de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica*): <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3432/1/40419.pdf>

- Vélez, P., Posada, F., Marín, P., Gonzales, M. T., Osorio, E., & Bustillo, Á. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Chinchiná, Colombia.
- Vergara, R. (2005). Trips y acaros de invernadero complejo biológico de impacto fitosanitario.
- Vergaras, R. (2005). Trips y acaros de invernadero complejo biológico de impacto fitosanitario.
- Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericina, un compuesto bioactivo producido por hongos: una breve reseña. *Moléculas*, 17(3), 2367-2377. doi:10.3390 / molecules17032367
- Wang, S., Miao, X., Zhao, W., Huang, B., Fan, M., Li, Z.-z., & Huang, Y. (2005). Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*, 1364-1372. doi:10.1017/s0953756205003709.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & J.Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *In PCR Protocols: A guide to* (págs. 315 - 322). San Diego: Academic Press.
- Wu, S., Gao, Y., Zhang, Y., Wang, E., Xu, X., & Lei, Z. (2014). An Entomopathogenic Strain of *Beauveria bassiana* against *Frankliniella occidentalis* with no Detrimental Effect on the Predatory Mite *Neoseiulus barkeri*: Evidence from Laboratory Bioassay and Scanning Electron Microscopic Observation. *PLoS One*, e84732. doi:10.1371/journal.pone.0084732
- Yanchapaxi, J., Calvache, M., & Lalama, M. (2010). Elaboración de un manual técnico-práctico del cultivo de rosas (*Rosa* sp.) para exportación. *Rumipamba*, 1-6.
- Zevallos, J. M., Cango, M. N., & Dale-Larraburre, W. (2013). patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione*

juno (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12, 75-81.