



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

**“EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS ENTOMOPATÓGENOS
SOBRE ADULTOS DE *Liriomyza* spp. EN CHAVEZPAMBA, PICHINCHA”**

Trabajo de grado previa a la obtención del Título de Ingeniería en Agropecuaria

AUTORA:

FONTE CUASCOTA SOLEDAD ELIZABETH

DIRECTOR/A:

Lcda. IMA SUMAC SÁNCHEZ DE CÉSPEDES MSc.

Ibarra, abril 2021

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERIA EN

AGROPECUARIA

**“EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS ENTOMOPATÓGENOS
SOBRE ADULTOS DE *Liriomyza* spp. EN CHAVEZPAMBA, PICHINCHA”**

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación
como requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

APROBADO:

Lcda. Ima Sánchez, M.Sc.

DIRECTOR



FIRMA

Ing. Julia Prado, PhD.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

Ing. Juan Pablo Aragón, M.Sc.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004336333		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Fonte Cuascota Soledad Elizabeth		
DIRECCIÓN:	González Suárez		
EMAIL:	sefontec@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	2918-476	TELÉFONO MÓVIL:	0988198178

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ADULTOS DE <i>Liriomyza</i> spp. EN CHAVEZPAMBA, PICHINCHA"
AUTOR (ES):	Soledad Elizabeth Fonte Cuascota
FECHA: DD/MM/AAAA	06/03/2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería Agropecuaria
ASESOR /DIRECTOR:	Lic. Ima Sánchez, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 11 días del mes de abril de 2021

.....
Fonte Cuascota Soledad Elizabeth

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Fonte Cuascota Soledad Elizabeth, bajo mi supervisión.

Ibarra, a los 12 días del mes de abril de 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Irma Sánchez', written over a horizontal line.

Lcda. Irma Sánchez, M.Sc.

DIRECTOR DE TESIS

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA-UTN

Fecha: Ibarra, a los 11 días del mes de abril de 2021

Soledad Elizabeth Fonte Cuascota: “EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ADULTOS DE *Liriomyza* spp. EN CHAVEZPAMBA, PICHINCHA” /Trabajo de titulación. Ingeniera Agropecuario.

Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Ibarra, a los 11 días del mes de abril del 2021, 88 páginas.

DIRECTORA: Lc. Ima Sánchez, M.Sc.

- El objetivo principal de la presente investigación fue: Evaluar la patogenicidad de los aislados entomopatógenos sobre adultos de *Liriomyza* spp.
- Entre los objetivos específicos se encuentran: Determinar la diversidad de hongos entomopatógenos del cultivo crisantemo. Caracterizar la diversidad de hongos entomopatógenos aislados. Cuantificar el porcentaje de mortalidad corregido en adultos de *Liriomyza* spp. tratados con los hongos entomopatógenos aislados.

.....
Lcda. Ima Sánchez, M.Sc.

Directora de Trabajo de Grado

Fonte Cuascota Soledad Elizabeth

Autor

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, a mis padres por hacer realidad este sueño tan anhelado quienes, con gran amor me han ayudado, guiado en el transcurso de la vida con sus consejos oportunos, el respeto y su comprensión en mis buenos y malos momentos.

A la Ing. Julia Prado, PhD por haberme brindado la oportunidad de participar en esta investigación y guiarme durante toda esta trayectoria en conjunto con la colaboración de la Lcda. Ima Sánchez, M.Sc, Ing. Juan Pablo Aragón, M.Sc, Ing. Luis Moncayo, M.Sc. y Ing. Andrea Carrasco; que además de enseñarme la parte académica científica, compartieron sus conocimientos lo cual fue de gran ayuda y me ayudaron a generar soluciones.

A la empresa Florisol por haber permitido la realización de la investigación utilizando controladores biológicos, un agradecimiento especial al Ing. Ricardo Félix por su colaboración en todo momento.

A mis amigos y familiares que me apoyaron en todo momento para llegar a cumplir este objetivo tan anhelado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Problema.....	2
1.3. Justificación.....	2
1.4. Objetivos	4
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.5. Preguntas directrices (objetivo 1 y 2).....	4
1.6. Hipótesis (objetivo 3).....	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1. Origen e importancia del crisantemo	5
2.2. Manejo del cultivo de crisantemo	5
2.3. Plagas del crisantemo	6
2.3.1. Araña roja (<i>Tetranychus urticae</i> Koch)	6
2.3.2. Trips (<i>Frankliniella occidentalis</i> P.)	6
<i>Frankliniella occidentalis</i> P. poseen un ciclo de vida corto, los adultos pueden sobrevivir de cuatro hasta cinco semanas a temperaturas de 25-30 °C, mientras que para completar un ciclo necesitan de 13 a 15 días (Bustillo, 2009). El ciclo biológico consiste en huevo, dos etapas larvales con alimentación activa, dos etapas de pupas inactivas y la etapa adulta (Figura 2) (Bustillo, 2009; Reitz, 2009).	7
2.3.3. Minador de hoja (<i>Liriomyza</i> spp.)	7
2.4. Manejo integrado de plagas.....	9
2.4.1. Control cultural	9

2.4.2. Control físico y mecánico	10
2.4.3. Control químico.....	10
2.4.4. Control biológico.....	10
2.5. Marco legal.....	14
CAPÍTULO III	15
MARCO METODOLÓGICO	15
3.1. Caracterización del área de estudio	15
3.2. Materiales y métodos	15
3.2.1. Materiales, equipos, insumos y herramientas.....	15
3.3. Fase descriptiva	16
3.3.1. Métodos.....	16
3.3.2. Manejo del experimento.....	22
3.4. Fase experimental.....	30
3.4.1. Métodos.....	30
3.4.2. Manejo del experimento.....	33
CAPÍTULO IV	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. Identificación de los aislados entomopatógenos	38
4.1.1. <i>Beauveria</i> spp.....	38
4.1.2. <i>Metarhizium</i> sp.....	39
4.2. Caracterización morfológica	42
4.3. Diversidad de Hongos Entomopatógenos	46
4.4. Crecimiento	48
4.5. Viabilidad (%).....	53
4.6. Mortalidad <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard.....	55
4.7. Infestación <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard.....	58
CAPÍTULO V	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
5.1. Conclusiones	62
5.2. Recomendaciones.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Tetranychus urticae</i> Koch	7
Figura 2. Ciclo biológico del trips.....	8
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Liriomyza</i> spp.	9
Figura 4. Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos	11
Figura 5. Características morfológicas de <i>B. bassiana</i> B.....	12
Figura 6. Características físicas de <i>Metarhizium anisopliae</i> Metschnes.....	13
Figura 7. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b) de género <i>Paecilomyces</i>	13
Figura 8. Mapa del área de estudio	15
Figura 9. Aislados de hongos entomopatógenos	17
Figura 10. Repique de los hongos entomopatógenos.....	18
Figura 11. Medición de crecimiento del hongo	18
Figura 12. Materiales empleados para la medición de la variable esporulación.....	19
Figura 13. Obtención de esporas de los hongos entomopatógenos.....	19
Figura 14. Cosecha de esporas de los hongos entomopatógenos. a) transferencia del hongo de la caja Petri al vaso de precipitación, b) solución del hongo aforado a 10 ml.	20
Figura 15. Diluciones seriadas de los aislados entomopatógenos.....	20
Figura 16. Esporas de los hongos entomopatógenos observadas al microscopio. a) áreas en donde se contaron las esporas (marcadas con una cruz), b) cuadrícula de conteo y conidios del hongo entomopatógeno (círculo).	21
Figura 17. Concentración de esporas del hongo por mililitro de suspensión en cajas Petri ...	21
Figura 18. Unidades Formadoras de Colonias de los aislados entomopatógenos.....	22
Figura 19. Recolección de muestra de rizósfera. a) planta de crisantemo, b) toma de muestra de la planta ornamental (moradilla) ubicada fuera del cultivo de crisantemo, c) muestras de los dos sitios, enfundadas y etiquetadas.....	23
Figura 20. Muestras de cada sitio de recolección.	23
Figura 21. Diluciones seriadas de la muestra de rizósfera	24
Figura 22. Material de trabajo para el aislamiento de microorganismo.....	25

Figura 23. Crecimiento microbiano de la muestra del suelo.....	25
Figura 24. Plantas asintomáticas del estudio. a) planta de crisantemo, b) planta ornamental (moradilla).....	26
Figura 25. Macerado de las hojas recolectadas	26
Figura 26. Siembra de la solución de muestras de hojas. a= 0.5 ml de solución en cajas Petri, b=presencia de microorganismos a las 72 horas.	27
Figura 27. Diversidad de microorganismos del macerado de hojas.....	28
Figura 28. Microorganismos del macerado de hojas visto en el microscopio. a) hongo entomopatógeno de acuerdo a las características microscópicas (40X), b) hongo ambiental (40X)	28
Figura 29. Materiales para realizar el método de conservación en frío	29
Figura 30. Muestra que se procedió a conservar en frío	29
Figura 31. Diseño experimental de la investigación	31
Figura 32. Unidad experimental de la investigación.....	32
Figura 33. Cámaras de cría del insecto minador	33
Figura 34. Cámaras de cría del insecto minador. a) cámaras de cría de la mosca minadora, b) <i>Liriomyza huidibrensis</i> Blanchard	34
Figura 35. Réplica de los microorganismos entomopatógenos. a) repique del hongo <i>Beauveria</i> spp., b) repique del aislado <i>Metarhizium</i> sp., c) repique del hongo <i>Paecilomyces</i> spp.	34
Figura 36. Cosecha de las esporas de los microorganismos aislados	35
Figura 37. Inoculación del aislado entomopatógeno en los bioensayos. a=bioensayos con hojas de crisantemo, papel absorbente, ADE, insecto minador y las diluciones seriadas (1 a 10 ⁶ conidios/ml), mientras, b=método de aplicación de aislado entomopatógeno a cada bioensayo (1 ml por frasco de vidrio).....	36
Figura 38. Bioensayo de la investigación	36
Figura 39. Insecto muerto e infestado	37
Figura 40. Cultivo in vitro de <i>Beauveria</i> spp. aislado de a) suelo crisantemo, b) macerado hojas crisantemo, c) suelo bosque y d) macerado de hojas bosque.....	39
Figura 41. Cultivo in vitro de <i>Beauveria bassiana</i>	40
Figura 42. Cultivo in vitro de <i>Metarhizium</i> sp. obtenido de una muestra de la rizósfera de moradilla. a) cultivo de <i>Metarhizium</i> sp. de siete días, b) aislado del género <i>Metarhizium</i> de 15 días	40

Figura 43. Cultivo in vitro de <i>Metarhizium anisopliae</i> Metschn	41
Figura 44. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Paecilomyces</i> spp obtenido de tres muestras de suelo y dos macerados de hojas de planta crisantemo y moradilla: a) rizósfera del crisantemo, b) macerado de hojas de crisantemo, c, e) rizósfera de <i>Alternanthera porrigens</i> Kuntze, d) macerado de hojas de <i>Alternanthera porrigens</i> Kuntze.....	42
Figura 45. Cultivo in vitro de <i>Paecilomyces</i> sp.	42
Figura 46. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados para las variables cualitativas de 10 aislados de hongos entomopatógenos compuestos por tres géneros <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> y <i>Paecilomyces</i>	47
Figura 47. Crecimiento de las colonias de tres géneros de hongos entomopatógenos <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> y <i>Paecilomyces</i>	50
Figura 48. Esporulación de tres géneros de hongos entomopatógenos <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> y <i>Paecilomyces</i>	52
Figura 49. Viabilidad de tres géneros de hongos entomopatógenos <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> y <i>Paecilomyces</i>	54
Figura 50. Mortalidad de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard con el género <i>Beauveria</i>	56
Figura 51. Mortalidad de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard con el género <i>Paecilomyces</i> ...	57
Figura 52. Mortalidad de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard al aplicar <i>Metarhizium</i> sp.....	58
Figura 53. Infestación de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard por el género <i>Beauveria</i>	59
Figura 54. Infestación de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard por el género <i>Paecilomyces</i> ...	60
Figura 55. Infestación de <i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard por el género <i>Metarhizium</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales, equipos, insumos y herramientas.....	16
Tabla 2. Niveles del factor (Dosis del hongo 10^6 UFC/ml)	30
Tabla 3. Esquema del ADEVA para un diseño en bloques completos al azar (DBCA)	32
Tabla 4. Características morfológica y cultural de los hongos aislados.....	43
Tabla 5. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para crecimiento	48
Tabla 6. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para esporulación.....	51
Tabla 7. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para viabilidad	53
Tabla 8. Pruebas de hipótesis secuenciales para mortalidad	55
Tabla 9. Pruebas de hipótesis secuenciales para infestación.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo.....	72
Anexo 2. Registro de temperatura y humedad relativa de los aislados entomopatógenos.....	73
Anexo 3. Fungicida y antibiótico.....	74

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AISLADOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ADULTOS DE *Liriomyza* spp. EN CHAVEZPAMBA, PICHINCHA

Autora: Soledad Elizabeth Fonte Cuascota

Universidad Técnica del Norte

Correo: sefontec@utn.edu.ec

RESUMEN

Liriomyza spp. es una de las plagas con mayor incidencia en el cultivo de crisantemo, afecta la fotosíntesis, disminuye la calidad de la flor y su valor comercial, por lo que los hongos entomopatógenos podrían ser un componente dentro del manejo integrado de plagas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la patogenicidad de cuatro cepas de *Beauveria* spp., una de *Metarhizium* sp., y cinco de *Paecilomyces* spp. sobre adultos de la mosca minadora. Para el efecto, se realizaron aislamientos a partir de muestras de hojas asintomáticas y rizósfera del cultivo de crisantemo y de una planta ornamental (*Alternanthera porrigens* Kuntze) fueron recolectadas de dos sitios, dentro y fuera del área de producción de *Chrysanthemum* sp. de la finca Florisol (Cantón Quito). Después de obtener los cultivos puros se procedió a la caracterización macroscópica (forma, color, tamaño, textura, aspecto) de los mismos, lo que ayudó a la identificación de los hongos entomopatógenos aislados. La infección fue realizada mediante aspersión de 1 ml de 10^6 conidios/ml sobre el insecto *Liriomyza huidobrensis* Blanchard. Las 10 cepas presentaron porcentajes diferentes de mortalidad, lo cual fue directamente proporcional a las concentraciones del inóculo. *Paecilomyces*, aislado de las hojas de moradilla obtuvo el porcentaje más alto 81.6%, seguido por *Beauveria*, proveniente del mismo lugar con 80.6% y por último *Metarhizium* y *Paecilomyces* obtenidos del suelo bosque con 43.1 y 31.4% de mortalidad del insecto de la mosca minadora. Se concluye que los géneros *Beauveria* y *Paecilomyces* tienen gran potencial como controlador biológico.

Palabras clave: control biológico, plagas, mortalidad

EVALUATION OF THE PATHOGENICITY OF THE ISOLATED ENTOMOPATHOGENS ON ADULTS OF *Liriomyza* spp. IN CHAVÉZPAMBA, PICHINCHA

Author: Soledad Elizabeth Fonte Cuascota

Universidad Técnica del Norte

Email: sefontec@utn.edu.ec

ABSTRACT

Liriomyza spp. is one of the pests with highest incidence in chrysanthemum cultivation, affects photosynthesis, decreases the quality of the flower and its commercial value. Entomopathogenic fungi could be a component of integrated pest management to control this pest. The objective of this research was to evaluate the pathogenicity of four strains of *Beauveria* spp., one of *Metarhizium* sp., and five of *Paecilomyces* spp. on miner fly adults. Isolations were made from samples of asymptomatic leaves and rhizosphere of the chrysanthemum culture and from an ornamental plant (*Alternanthera porrigens* Kuntze) were collected from two sites, inside and outside the production area of *Chrysanthemum* sp. from the Florisol farm (Quito canton). After obtaining the pure cultures, characterization was proceeded by microscope (shape, color, size, texture, appearance) identifying the isolated entomopathogenic fungi. The infection was carried out by spraying 1 ml of 10^6 conidia / ml on specimens of *Liriomyza huidobrensis* Blanchard. The 10 strains showed different percentages of mortality, which was directly proportional to the concentrations of the inoculum. *Paecilomyces* isolated from moradilla leaves, showed the highest percentage 81.6%, followed by *Beauveria*, coming from the same place with 80.6%. *Metarhizium* and *Paecilomyces* obtained from the forest soil with 43.1 and 31.4% mortality of the leaf miner insect. This research suggests that *Beauveria* and *Paecilomyces* could be considered as potential biological control agent.

Keywords: biological control, pests, mortality

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La floricultura se ha incrementado notablemente a nivel mundial durante los últimos años, destacándose las flores de corte, entre ellas, rosas (*Rosa* sp.), claveles (*Dianthus caryophyllus* L.) y crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) (Yong, 2004). Ecuador no ha sido la excepción, junto a Holanda y Colombia son los principales productores y exportadores en el ámbito florícola (Tejeda, Ríos, Trejo y Vaquera, 2015; Van Uffelen y de Groot, 2005). En el país la superficie dedicada al cultivo de flores en el 2019 fue de 9 316 hectáreas, las rosas (*Rosa* sp.), gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.) e hypericum (*Hypericum perforatum* L.) representaron el 74.29%, seguidas por el aster (*Aster* sp.) y otras flores con el 3.10% y 22.61% respectivamente (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2019). En el año 2019 se exportaron 158 337.48 T de flores de corte incrementándose este rubro un 2.34% con relación al año 2018; el *Chrysanthemum* sp. ocupó el séptimo lugar con un valor de 1 116.33 T y un aumento de 0.15% con respecto al año 2018 (Expoflores, 2019).

El crisantemo es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, sin embargo, es afectado por la presencia de diversas plagas y enfermedades. Una de las principales plagas es el insecto minador (*Liriomyza* spp.) que causa daños directos al follaje, afectando la calidad de la flor y su valor comercial (Rimache, 2013).

Sin embargo, la tendencia del mercado es adquirir bienes que hayan sido producidos con un manejo amigable con el ambiente y una de estas alternativas es el control biológico que reemplaza al uso de pesticidas, dentro de las cuales se encuentran los hongos entomopatógenos (Nava-Pérez, García-Gutiérrez, Camacho-Báez y Vázquez-Montoya, 2012).

Para Motta y Betselene (2011), los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos benéficos que se puede utilizar dentro de los sistemas agroecológicos, tienen varias funciones, entre ellas, la capacidad de regular las plagas. Además, existen más de 750 especies de hongos benéficos, entre las especies más importantes están *Metarhizium anisopliae* Metschn y *Beauveria bassiana* B. (Faria y Wraight, 2007), las cuales evaluaron Osorio y Canal (2011) en la mortalidad de *Anastrepha obliqua* Macquart donde obtuvieron resultados superiores al 90% de infección a las 120 h, en condiciones de laboratorio. También, Ríos et al. (2020) estudiaron

la combinación del género de *Beauveria* y *Metarhizium* para el control de *Bemisia tabaci* G. (mosca blanca) en cultivos acuapónicos lo cual fue muy eficaz con el 73% de mortalidad.

A su vez, los microorganismos entomopatógenos al ser esparcidas en el ambiente generan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos-plaga (Pucheta, Flores, Rodríguez, y De la Torre, 2006). Por ende, estos hongos benéficos tienen la capacidad de multiplicarse aceleradamente y generar buenos resultados en cuanto a la mortalidad de la plaga (Vázquez et al., 2010).

1.2. Problema

Reyes (com. personal, 2018) menciona que de los 900 monitoreos realizados por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) de flores y follajes en florícolas ecuatorianas, desde mayo a noviembre de 2018, se registraron 636 detenciones por presencia de plagas en ornamentales; el 57% de las detenciones presentaron trips, 8% ácaros, 5% minador, 1% áfidos y 29% otras causas; estas intercepciones implican pérdidas económicas al exportador debido a que se decomisa el embarque que era destinado a exportación.

Liriomyza spp. es una de las plagas con mayor incidencia en el cultivo de crisantemo, afecta la fotosíntesis de la planta, disminuye la calidad de la flor y el valor comercial (Rimache, 2013). Por lo cual obliga al productor a realizar aplicaciones semanales de plaguicidas disponibles en el mercado que no garantizan la eficiencia de control de la plaga, además, el insecto se ha vuelto resistente a este tipo de control (Vargas, Olivares y Ubillo, 2008; Naranjo, 2017), originando un incremento de aplicaciones que, afectan negativamente al medio ambiente, así como a la salud de los trabajadores (Puerto, Suárez y Palacio, 2014).

Además, Barg y Armand (2007) señalan que, en cada aplicación de agroquímicos, del 25 al 66% no llegan a cubrir la planta y se pierden, contaminando ríos, aguas subterráneas, suelo y eliminando a los enemigos naturales. Entre ellos estarían los hongos entomopatógenos que podrían ser un componente dentro del manejo integrado de plagas (Pucheta et al., 2006; Rimache, 2011).

1.3. Justificación

Los hongos entomopatógenos son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin provocar daños graves al ambiente o empeorar la contaminación del medio ambiente (Nava et al., 2012). En la

finca florisol, están buscando alternativas para el control del insecto minador en el cultivo de crisantemo.

Villegas et al., (2017) evaluaron bajo condiciones de laboratorio la susceptibilidad del psílido de la papa a dos cepas comerciales y dos nativas de *Metarhizium anisopliae* Metschn y *Beauveria bassiana* B, en donde se ensayaron cinco dosis sobre ninfas del tercer estadio de *B. cockerelli* Sulc todos los tratamientos resultaron patogénicos para el psílido de la papa, sin embargo, las más tóxicas fueron las cepas comerciales, que provocaron una mortalidad variable de 90 y 100%.

Por otra parte, la evaluación realizada por Rodríguez, Gerding y France (2006) bajo condiciones de laboratorio de la virulencia y efectividad de *Metarhizium anisopliae* Metschn y *Beauveria bassiana* Bals en el control de polilla del tomate, con concentraciones hasta 10^8 conidios ml/l aplicados directamente en larvas de tercer estadio utilizando el sistema de pulverización torre Potter, obtuvo mortalidades superiores al 90% a los 14 días.

También, Migiro, Maniania, Chabi y Vandenberg (2010) evaluaron la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* Metschn y *Beauveria bassiana* B. contra el adulto *Liriomyza huidobrensis* B. de la hoja de *Pisum sativum* L. El insecto plaga fue contaminado con conidios mediante un material llamado terciopelo, se obtuvo una mortalidad de 40% con *Metarhizium anisopliae* Metschn y 100% con *Beauveria bassiana* Bals a los cinco días, esta investigación se realizó en condiciones de laboratorio.

Noujeim, Sakr, El Sayegh y Nemer (2015) en un estudio bajo condiciones de laboratorio demostraron que *Beauveria bassiana* B. con dosis de 5000, 500, 50 y 5 esporas sobre pupa de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard produjeron una mortalidad entre 73 al 97%, sin embargo, los tratamientos con el hongo entomopatógeno comercial *Paecilomyces lilacinus* T. causó una mortalidad de pupas de 76%.

Considerando la problemática existente en el manejo convencional de plagas, así como la eficacia mencionada de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* B., *Metarhizium anisopliae* M. y *Paecilomyces lilacinus* T.), la presente investigación consiste en realizar aislamientos de hongos entomopatógenos para su evaluación en el control del insecto plaga minador que afecta el cultivo de crisantemo.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de los aislados entomopatógenos sobre adultos de *Liriomyza* spp.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la diversidad de hongos entomopatógenos del cultivo crisantemo.
- Caracterizar la diversidad de hongos entomopatógenos aislados.
- Cuantificar el porcentaje de mortalidad corregido en adultos de *Liriomyza* spp. tratados con los hongos entomopatógenos aislados.

1.5. Preguntas directrices (objetivo 1 y 2)

¿Existen hongos resultantes en los aislamientos de la rizósfera y tejido vegetal que puedan ser usados como agentes biocontroladores del minador?

¿Se encuentra una alta diversidad de aislados de hongos entomopatógenos para controlar el insecto *Liriomyza* spp?

1.6. Hipótesis (objetivo 3)

Ho: Los diferentes aislados de hongos entomopatógenos no presentan efecto en el porcentaje de mortalidad corregido del insecto minador.

Ha: Al menos uno de los hongos entomopatógenos mostrará efecto en el porcentaje de mortalidad corregido del insecto minador.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Origen e importancia del crisantemo

Rimache (2013) menciona que el *Chrysanthemum* spp. es originario de China, donde se le conoce como una planta ornamental. Además, es miembro de la familia Asteraceae dentro del género *Dendranthema* y tiene diferentes usos, como planta para maceta, flor cortada, jardín y en el paisajismo (Azadia, Bagherib, Molaahmad, Nazarid, y Chandlere, 2016). También posee una flor compuesta debido a que los cultivares actuales son híbridos que contienen a varios ancestros hexaploides de los cuales en total se han registrado más de 20 000 variedades (Anderson, 2007).

El crisantemo es considerado como una de las flores más populares a nivel mundial, principalmente desde el punto de vista comercial, especialmente los de color blanco y amarillo, ya que son los más requeridos en los mercados internacionales como Estados Unidos y Europa (Pandía y Saxena, 2001). Este cultivo se adapta en suelos arenosos con un Ph de 6.2 a 7.0, actualmente se cultiva bajo invernadero manteniendo una temperatura entre 15-25°C y una humedad relativa de 65-70%; Por otra parte, se utiliza luz artificial para complementar las 14 horas luz que requiere el cultivo, el ciclo del cultivo es de 3 a 3.5 meses desde la siembra hasta la cosecha (Instituto de investigación y capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de Mexico 2014).

2.2. Manejo del cultivo de crisantemo

La producción del crisantemo inicia con la preparación de las camas la cual consiste en el barbecho (40 cm de profundidad), rastreo y nivelación, seguidamente se realiza la desinfección del suelo con la finalidad de evitar la presencia de plagas y enfermedades, en la siembra se utiliza 69 esquejes por m² con las siguientes características: tallo de 7 a 8 cm, raíces de 1 a 2.5 cm de largo y con seis a siete hojas por planta. En cuanto a la fertilización el cultivo requiere de 40.3, 17.4, 19.2, 5.01, 4.4 g de N, P, K, Ca y Mg por m² parcializados durante el todo el ciclo (Gaytán, Ochoa, García, Zavaleta y Mora, 2006; Valdez, Hernández, Alvarado y Cruz, 2015); a su vez esta planta ornamental es afectada por diversas plagas y enfermedades, las cuales se detalla a continuación.

2.3. Plagas del crisantemo

Este cultivo es afectado por numerosas plagas entre ellas los trips (*Frankliniella occidentalis* P.), minador (*Liriomyza trifolii* Burgess), araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), los dos primeros son de gran importancia debido a las pérdidas económicas y daños ocasionados en la calidad de la flor y el follaje (Vázquez, 2016). A su vez, para el control de estas plagas se puede utilizar controladores biológicos, ya que ellos tienen una gran capacidad para regular y mantenerlas en niveles adecuados (Motta y Betselene, 2011).

2.3.1. Araña roja (*Tetranychus urticae* Koch)

La araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) es una plaga polífaga, afecta alrededor de 1 100 especies vegetales en 140 familias diferentes (Gribić et al., 2011) y su ataque es severo en cultivos ornamentales, en el cual afecta la calidad de la flor y reduce la competitividad de los floricultores en los mercados internacionales (Flores, Silva, Tapia y Casals, 2007). La mayor parte de los ácaros viven en las partes aéreas de las plantas y se alimentan de la microflora y artrópodos pequeños que habitan en las plantas. Esta plaga introduce su aparato bucal en forma de aguja para alimentarse de las células y tejidos de la planta (Van Leeuwen, Vontas, Tsagkarakou y Tirry, 2009).

Debido a su ciclo de vida corto, de 22 a 30 días, es capaz de generar resistencia y resistir a las aplicaciones de acaricidas. Esto incrementa los costos de producción, y reduce la rentabilidad de cultivo, por lo cual se debe combatir desde la etapa de brotación, porque luego la estructura misma de la hoja hace difícil el control (Vazquez, 2016). El ciclo de vida (Figura 1) en condiciones normales es de 30 días mientras que bajo invernadero en temperaturas de 25-30°C se reduce hasta 22 días, el mismo está conformado por cinco etapas que son: huevos que eclosionan alrededor de dos a cuatro días, larva de dos a tres días, la fase protoninfa y deutoninfa que dura hasta siete días y adulto (Forero, Rodríguez, Cantor, Rodríguez y Cure, 2008).

2.3.2. Trips (*Frankliniella occidentalis* P.)

En la floricultura los trips-insectos polípagos son uno de los problemas fitosanitarios de gran importancia, no sólo por el daño directo que causan las larvas y los adultos al picar y succionar el contenido celular de los tejidos e inyectar saliva fitotóxica, lo que genera manchas superficiales blanquecinas en la epidermis de las hojas, pétalos y deformación de meristemas, sino también porque algunos de ellos son transmisores de enfermedades (Arévalo, Quintero y Correa, 2003; Rhains, Doyon, Rivoal y Brodeur, 2007).



Figura 1. Ciclo biológico de *Tetranychus urticae* Koch

Fuente: Tehri (2014)

Esta plaga se alimenta, oviposita y transmite virus en las plantas, lo que ocasiona alteraciones en el tejido vegetal como cicatrices además de otras imperfecciones. Este insecto puede provocar daños severos, si no hay control, el ataque, continúa hasta que la planta deja de crecer (Vázquez, 2016).

Frankliniella occidentalis P. poseen un ciclo de vida corto, los adultos pueden sobrevivir de cuatro hasta cinco semanas a temperaturas de 25-30 °C, mientras que para completar un ciclo necesitan de 13 a 15 días (Bustillo, 2009). El ciclo biológico consiste en huevo, dos etapas larvales con alimentación activa, dos etapas de pupas inactivas y la etapa adulta (Figura 2) (Bustillo, 2009; Reitz, 2009).

2.3.3. Minador de hoja (*Liriomyza* spp.)

Salvo y Valladares (2007) mencionan que los minadores de hoja pertenecen al género *Liriomyza* conformado por más de 300 especies, 23 de ellas son de importancia económica a nivel mundial, por el hecho de no ser susceptibles a los insecticidas, los minadores en estado inmaduro viven y se alimentan dentro de las hojas, consumiendo el mesófilo esponjoso sin dañar la epidermis foliar. El minador ataca a los cereales, leguminosas, hortalizas y plantas ornamentales, este insecto barrena o mina el tejido vegetal y debilita el sistema foliar formando

galerías en los tallos, hojas, frutos y raíces, secando y matando a las plantas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2010).

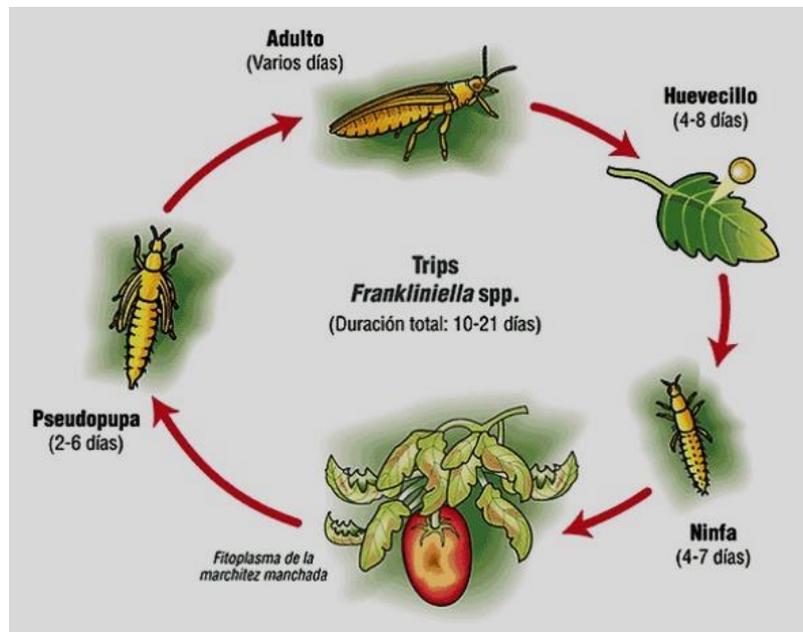


Figura 2. Ciclo biológico del trips

Fuente: Instituto de Investigaciones Agropecuarias (2011)

El ciclo biológico de *Liriomyza* spp. a mayor temperatura es más corto, consta de cuatro etapas: huevo, tres fases larvianas, pupa y adulto (Figura 3); los adultos minadores realizan picaduras en la parte superior de las hojas, las hembras ovipositan un huevo/picadura, estos eclosionan aproximadamente de cuatro a ocho días a temperatura ambiente, posteriormente las larvas pasan por tres estadios larvianos la última es prepupa que dura de cuatro a cinco horas finalmente la mayoría cae al suelo mientras que otras se mantienen en el área foliar, las pupas eclosionan a las tres semanas y emergen los adultos presentando una coloración amarillenta con manchas negras (Barranco, 2003; Weintraub et al., 2017).

Para el control de insectos, ácaros y otras plagas existen varios métodos, entre ellos está el cultural, biológico y químico, siendo el biológico el más importante, sin embargo, se puede justificar el uso adecuado de productos químicos sólo cuando la densidad de la plaga es de tal magnitud que sobrepasa el umbral de daño económico (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009).

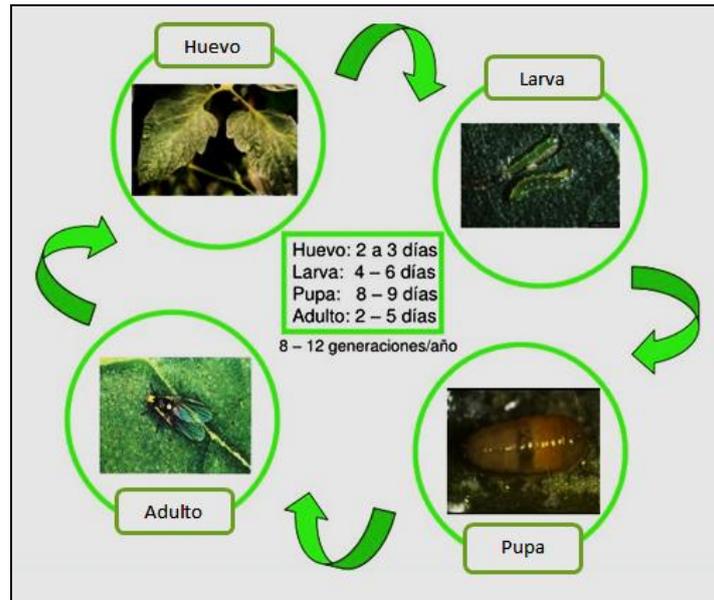


Figura 3. Ciclo biológico de *Liriomyza* spp.

Fuente: Minas (2013)

2.4. Manejo integrado de plagas

En la producción de plantas ornamentales uno de los aspectos más importantes es el fitosanitario, ya que de él depende la buena calidad de la misma, tanto para la producción nacional, de exportación, así como de importación. Las plagas asociadas pueden representar un alto riesgo potencial para la economía nacional; así, las plantas ornamentales procedentes del extranjero pueden ser portadoras de plagas cuarentenarias que en el país no existe, es así que el Ecuador se encuentra actualmente libre de más de 500 plagas de importancia económica (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2008).

Existen varias estrategias para mantener la fitosanidad de los cultivos, entre ellos está el manejo integrado de plagas (MIP) que tiene como función mantener el nivel del daño de enfermedades y plagas por debajo del umbral económico, para lo cual combina varias formas de control que son: control cultural, control químico, control físico, control mecánico, control biológico, entre otros (Badii, Landeros y Cerna, 2007).

2.4.1. Control cultural

Es el control más antiguo que tiene como objetivo interrumpir los ciclos reproductivos de las plagas mediante la multiplicación de los enemigos naturales, destrucción de plantas hospederas, rotación de cultivos, densidad de siembra óptima, adecuada preparación del suelo, riego,

siembra en épocas del año desfavorables para la multiplicación del insecto, asociación de cultivos, trampas con plantas repelentes, entre otros (Martínez, 2010).

2.4.2. Control físico y mecánico

Este método consiste en emplear medios físicos con el fin de matar a los insectos mediante cambios en su actividad fisiológica o generando un ambiente desfavorable para el desarrollo de los mismos, para esto se podría utilizar el fuego, modificar la temperatura, provocar inundaciones y el manejo del drenaje, mientras que el control mecánico se trata de la remoción y destrucción de las plantas infestadas por el insecto (Martínez, 2010).

2.4.3. Control químico

El control químico se trata del uso de productos químicos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, acaricidas con la finalidad de mantener el insecto-plaga bajo el umbral económico, sin embargo, este método provoca la contaminación ambiental, daño a la salud de los trabajadores, disminución de los enemigos naturales, entre otros (Jiménez, Pantoja, y Ferney, 2016).

2.4.4. Control biológico

El control biológico se define como, el uso de enemigos naturales en la regulación de las poblaciones de especies dañinas llamadas plagas, también presenta varias ventajas como: menos costo de producción, no hay resistencias, no hay efecto negativo para los trabajadores en el campo, actúa de manera permanente en una biodiversidad, y los productos son saludables para el consumidor (Duarte, 2012). Además, se basa en una agricultura compatible con el medio ambiente y con la sociedad en general (Vivas-Carmona, 2017).

En el control biológico se utilizan parasitoides, predadores, entomopatógeno como microorganismos, para nombrar a aquellos agentes del agroecosistema que van a actuar contra las plagas, dentro de los microorganismos beneficios se encuentran los hongos entomopatógenos (Paredes, Campos y Cayuela, 2013).

- **Hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son un extenso grupo de microorganismos capaces de atacar insectos (Motta y Betselene, 2011). Por ende tienen un gran potencial como agentes de control, ya que forman un grupo con más de 750 especies que al esparcirse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos, estos microbios inician su proceso infectivo

cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, el hongo comienza a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas, las cuales degradan la cutícula del insecto y ayudan en el proceso de penetración por presión mecánica iniciando por el apresorio (Pucheta et al., 2006).

Este modo de infección se da gracias a la acción coordinada de enzimas hidrolíticas, a más de la presión mecánica ejercida en el punto de contacto, las cuales son factores determinantes en el éxito de la infección en el interior del insecto (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009). El hongo entomopatógeno se desarrolla en forma de cuerpos hifales que se van disseminando a través del hemocele e invaden varios tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, causando la muerte del insecto después de tres a 14 días de iniciada la infección. Una vez muerto el insecto y ya agotados muchos de los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar e invade todos los órganos del hospedero (Figura 4) (Pucheta et al., 2006).

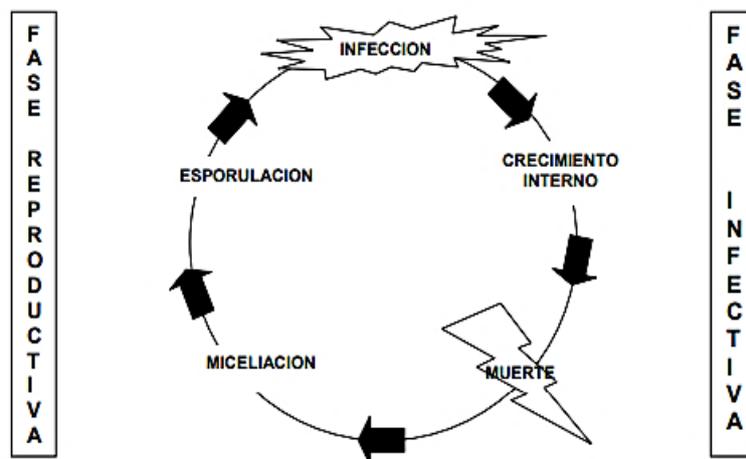


Figura 4. Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos

Fuente: García (2008)

Los hongos entomopatógenos con mejor eficiencia como agentes de control para el insecto minador son: *Beauveria bassiana* B. y *Metharizium anisopliae* Metschn, el hongo entomopatógeno *B. bassiana* B. pertenece a la clase Deuteromycetes, generalmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos, lo cual lo hace uno de los patógenos más importantes. Además, los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, muestran una capa blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo (Castillo et al., 2012).

Según García, Capello, Leshner y Molina (2011) la colonia de *Beauveria bassiana* B. es lanosa y polvosa debido a los abundantes conidios, al inicio es color blanco, luego en el centro de la colonia se torna amarillenta, de textura blanda y superficie plana (figura 5), este hongo se multiplica y se esparce dentro del mismo cultivo beneficiando la acción reguladora de la población de insectos-plaga. El proceso patogénico comienza en la cutícula del insecto, continuando con la germinación de los conidios y la producción de hifas invasoras, las cuales traspasan el hemocele y destruyen los órganos internos, para finalmente colonizar totalmente a la plaga (Belkis et al., 2011).

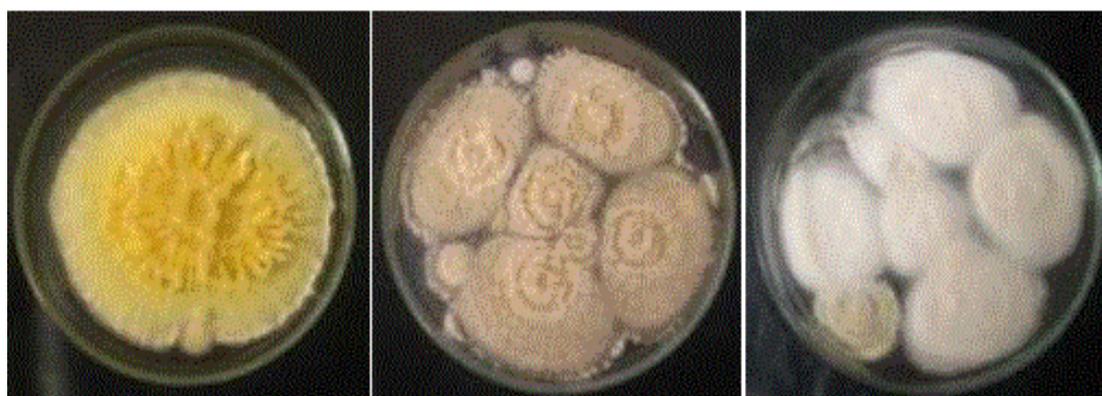


Figura 5. Características morfológicas de *B. bassiana* B.

Fuente: López (2017)

Metarhizium anisopliae Metschnes un hongo entomopatógeno que tiene un extenso rango de insectos huéspedes, y convive con alrededor de 200 especies que destruyen a los cultivos agrícolas, el mecanismo de acción de *M. anisopliae* Metschnes consiste en una penetración directa en la cutícula, mediante el cual se multiplica en el hemocele, ya dentro del hospedero, se alimenta de los nutrientes y forma micosis y posteriormente la muerte (García et al., 2014; Mnyone et al., 2009).

Las colonias de *M. anisopliae* Metschnes muestran un crecimiento de micelio con borde blanco y con grupos de conidióforos que se tornan coloreados al multiplicarse los conidios, con diferentes variaciones de color: de olivo a amarillo verdoso, de olivo a verde, decolorada en el envés, de color miel o amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el medio (Figura 6) (Padilla, Bernal, Vélez y Montoya, 2000). La acción del género *Metarhizium* depende de las condiciones ambientales y del tipo de hospedante.



Figura 6. Características físicas de *Metarhizium anisopliae* Metschnes

Fuente: Padilla et al. (2000)

Paecilomyces fumosoroseus Brown y Smith es un hongo que tiene varios hospedantes y una gran distribución geográfica, este microorganismo se le puede aislar del suelo, plantas e insectos como de órdenes homópteros, coleópteros y colémbolos (Chan et al., 2010). Las características microscópicas (Figura 7) del hongo son de micelio tabicado, conidióforos verticiliados, fialides subglobosa con un cuello estrecho de donde salen los conidios, mientras que las macroscópicas al inicio son de color blanco, que va cambiando a rosado liliáceo mientras va desarrollándose (Gómez, Zapata, Torres, y Tenorio, 2014).

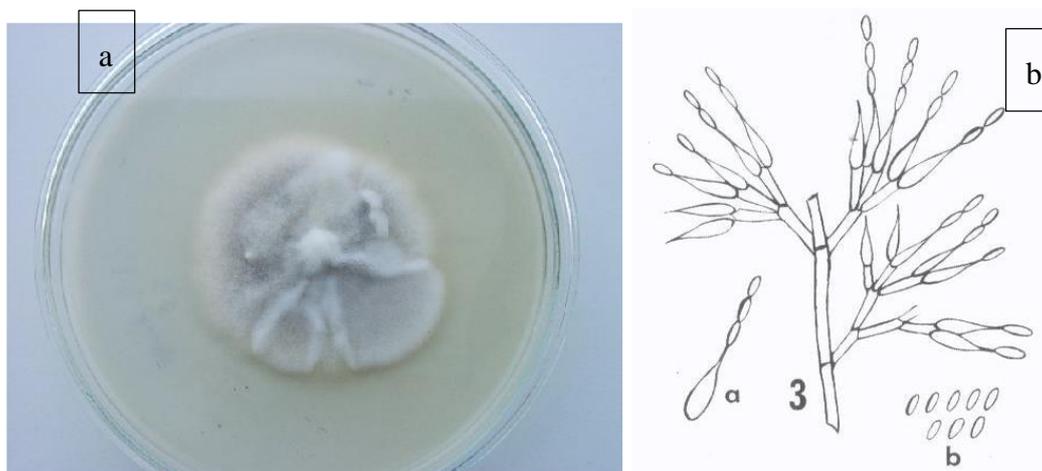


Figura 7. Características macroscópicas (a) y microscópicas (b) de género *Paecilomyces*

Fuente: Gómez, Zapata, Torres, y Tenorio (2014)

2.5. Marco legal

La presente investigación se encuentra dentro de lo establecido por la Constitución de la República del Ecuador (2008), principalmente en el capítulo VII en donde se menciona los derechos de la naturaleza. Por lo tanto, la presente investigación cumple con los siguientes artículos:

Art. 71.- La naturaleza es el lugar donde se reproduce y realiza la vida, tiene derecho a que se respete integralmente su existencia, el mantenimiento y regeneración de su ciclo vitales, estructura y procesos evolutivos. Para conseguir lo mencionado, principalmente se debería evitar el uso de pesticidas.

Art. 72.- Restaurar la naturaleza de los daños causados y disminuir el impacto ambiental mediante mecanismos eficaces y medidas adecuadas para mitigar las consecuencias ambientales nocivas.

Art. 73.- Evitar las actividades que puedan provocar la extinción de especies, destrucción de ecosistema o la alteración de los ciclos naturales para lo cual se prohíbe la introducción de organismos o material orgánico e inorgánico.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Caracterización del área de estudio

La presente investigación se realizó en el laboratorio de la finca Florisol, ubicada en la parroquia Chavezpamba, Cantón Quito, Provincia de Pichincha, bajo las coordenadas geográficas de altitud 1 925 m.s.n.m, latitud de $0^{\circ} 7' 56''$ Norte y con una longitud de $78^{\circ} 24' 51''$ Oeste (Figura 7).

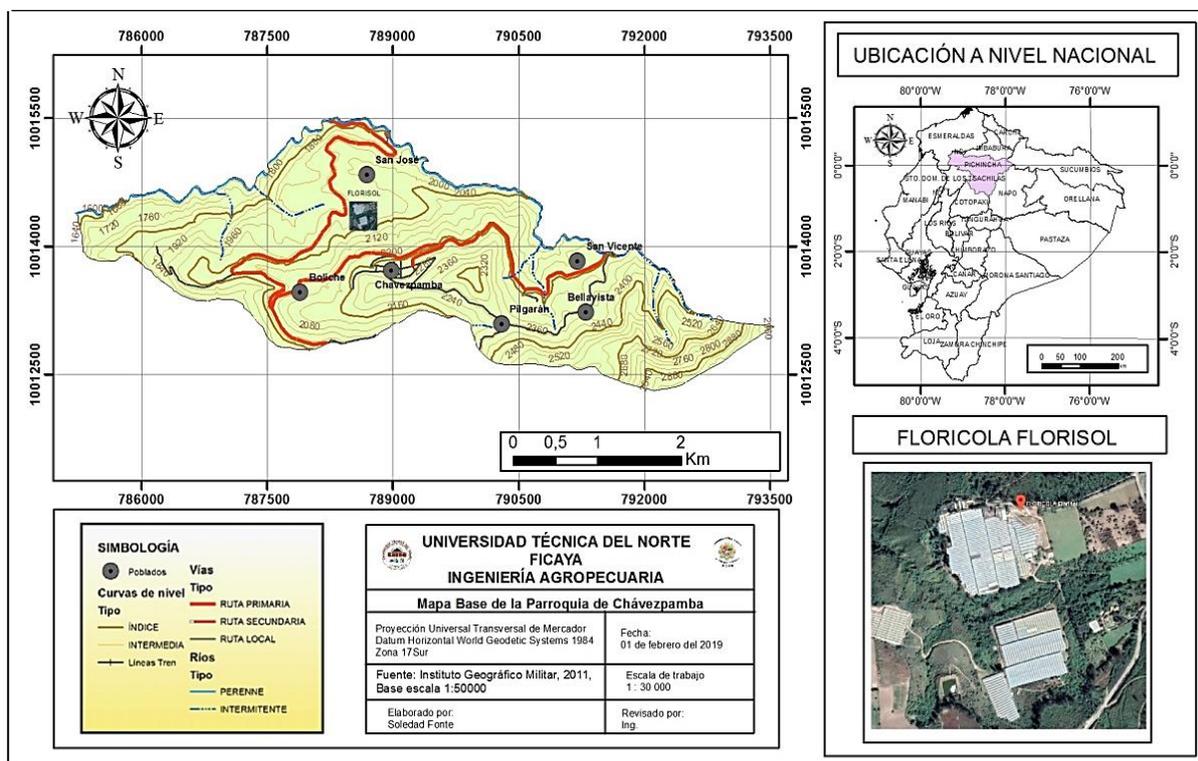


Figura 8. Mapa del área de estudio

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales, equipos, insumos y herramientas

Los materiales, insumos y herramientas que se utilizaron en el estudio se describen en la tabla 1.

Tabla 1*Materiales, equipos, insumos y herramientas*

Material genético	Equipos	Insumos	Herramientas
Aislados de hongos entomopatógenos	Microscopio	Agua destilada	Cajas Petri
Hojas de crisantemo	Estereoscopio	Papa-Dextrosa-Agar (PDA)	Tubos de ensayo
<i>Liriomyza huidobrensis</i> Blanchard (insecto minador)	Cámara de flujo laminar	Hipoclorito de sodio al 5%	Espátula Drigalsky
Insectos con micosis	Autoclave	Tween 20 al 0.05%	Probetas
	Cámara de Neubauer		Mortero Pistilo

3.3. Fase descriptiva

3.3.1. Métodos

La primera fase consta de la caracterización de los hongos entomopatógenos para lo cual se realizó un aislamiento de los mismos en un determinado tiempo, se seleccionaron dos sitios de colecta, dentro y fuera del área de producción de crisantemo. Los materiales recolectados fueron llevados al laboratorio para realizar el procedimiento de aislamiento.

3.3.1.1. Caracterización de los aislados

Se caracterizaron a 10 hongos entomopatógenos aislados a partir de hojas asintomáticas y muestras de rizósfera tomados a 20 cm de la superficie de la planta del crisantemo y moradilla.

Para cada microorganismo se utilizaron cinco cajas Petri, de las cuales se seleccionaron tres cajas libres de cualquier contaminación y se tomaron los datos requeridos.

3.3.1.1. Análisis estadístico

Para el análisis de varianza se utilizó el programa Infostat versión 2017, con la finalidad de interpretar las características de los aislados entomopatógenos. en donde se procedió a realizar las siguientes pruebas: estadística inferencial y análisis multivariado.

3.3.1.2. Variables en estudio

Una vez colocadas las soluciones de las muestras en las cajas Petri se observó una diversidad de hongos patogénicos, benéficos, ambientales, entre otros, de los cuales se seleccionaron los microorganismos entomopatógenos mediante las guías de (Barnett y Hunter, 1972; Humber, 1998; Cañedo y Ames, 2004) y se procedió a evaluar las siguientes características:

- **Crecimiento**

Para esto previamente en una misma fecha se sembraron 200 µl de todos los aislados entomopatógenos en tres cajas Petri con medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) (Anexo 1) de cada hongo (Figura 8) y se colocaron en diferentes incubadoras bajo condiciones controladas de temperatura 28 ± 2 °C, humedad relativa (HR) $60 \pm 5\%$, los cuales fueron registrados diariamente (Anexo 2) y un fotoperiodo distinto para cada hongo: *Beauveria* spp. (6:18h luz-oscuridad), *Paecilomyces* spp. (5:19h luz-oscuridad) y *Metarhizium* sp. luz permanente hasta que el hongo haya crecido completamente (siete días).

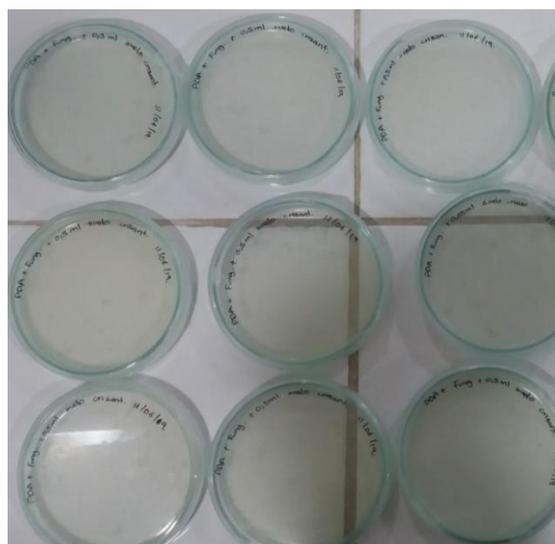


Figura 9. Aislados de hongos entomopatógenos

Se tomaron cinco inóculos con el sacabocado de 5 mm de cada hongo entomopatógeno y se sembró en el centro de cada caja Petri con medio PDA luego se colocaron en diferentes incubadoras bajo las mismas condiciones que el proceso anterior durante 15 días (Figura 9).



Figura 10. Repique de los hongos entomopatógenos

Se procedió a medir con el calibrador digital diariamente a partir del segundo día del momento de la siembra, determinándose así, el crecimiento radial sobre la longitud inicial. Se tomaron tres mediciones de cada hongo de las cinco cajas (Figura 10).

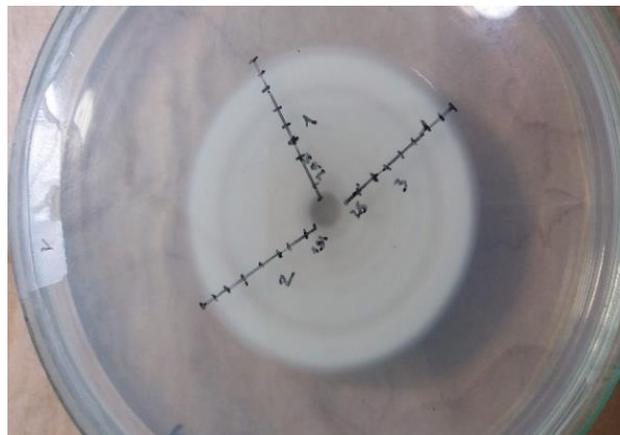


Figura 11. Medición de crecimiento del hongo

Para calcular el crecimiento final de cada hongo entomopatógeno se seleccionaron tres cajas Petri de acuerdo a las siguientes características, sin presencia de bacterias, limpias, uniformidad, entre otros, luego se promediaron todas las medidas de cada hongo para obtener el resultado final.

- **Esporulación**

De los cultivos a los cuales se evaluaron el crecimiento (variable anterior); se determinó la cantidad de esporas producidas con la ayuda de la cámara Neubauer y las diluciones seriadas.

El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron las tres cajas Petri de cada hongo y se llevaron a la cámara de flujo junto con los demás materiales, agua destilada estéril (ADE), cotonetes, gasas, ligas, frascos de 10 ml, espátula Drigalski, tubos de ensayo, puntas de 100 μ l y 5 ml, cámara Neubauer y el microscopio, todos estos materiales fueron totalmente esterilizadas (Figura 11).

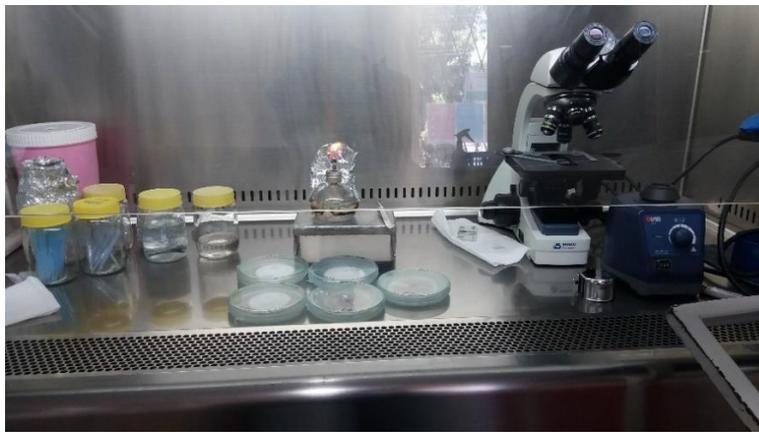


Figura 12. Materiales empleados para la medición de la variable esporulación

Con la ayuda de un hisopo estéril se hizo una mezcla homogénea con 10 ml de ADE, Tween 80 al 10% y el hongo dentro de la caja Petri (Figura 12).

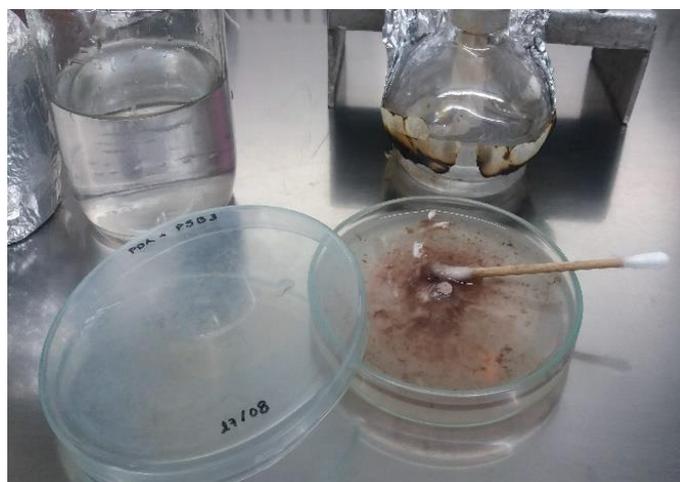


Figura 13. Obtención de esporas de los hongos entomopatógenos

La suspensión de esporas se recolectó en un vaso de precipitación estéril de 10 ml el cual contiene en su boquilla dos capas de gasa sujetas con liga. Todas las suspensiones se aforaron a 10 ml (Figura 13).

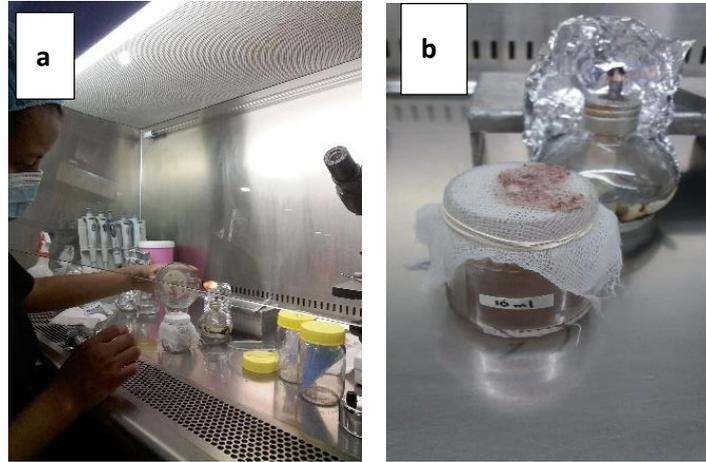


Figura 14. Cosecha de esporas de los hongos entomopatógenos. a) transferencia del hongo de la caja Petri al vaso de precipitación, b) solución del hongo aforado a 10 ml.

Se removió la muestra con la ayuda de una espátula y se tomó 1 ml de la solución madre, lo cual fue colocado en los tubos de ensayo estériles con 9 ml de ADE con el fin de realizar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) (Figura 14) y facilitar el conteo de esporas/ml.

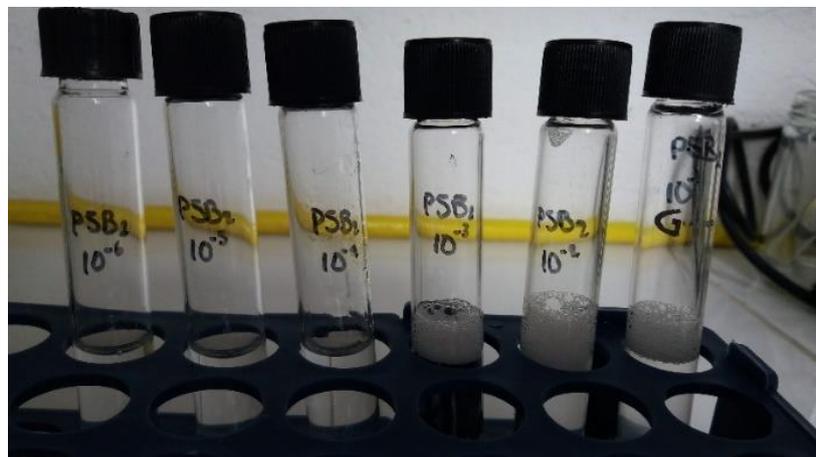


Figura 15. Diluciones seriadas de los aislados entomopatógenos

De las diluciones seriadas se tomó con una micropipeta 10 μ l (0.01 ml) de solución, se colocó en la cámara Neubauer para realizar el conteo de esporas con la ayuda del microscopio (40X). Se realizaron tres recuentos de esporas, sacando un promedio y multiplicando por la dilución utilizada, con el objetivo de trabajar con datos reales, y de esta manera determinar la variable esporulación (Figura 15).

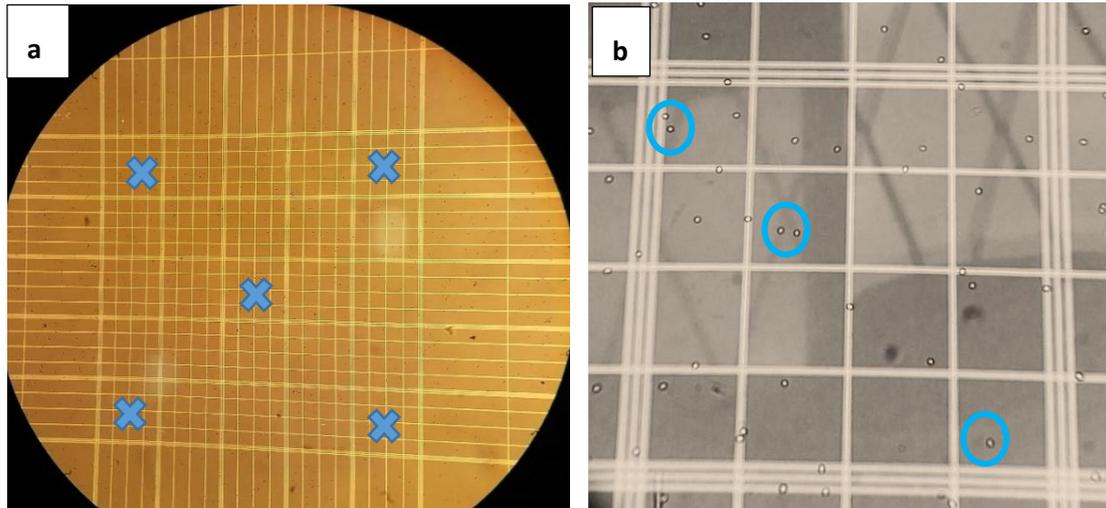


Figura 16. Esporas de los hongos entomopatógenos observadas al microscopio. a) áreas en donde se contaron las esporas (marcadas con una cruz), b) cuadrícula de conteo y conidios del hongo entomopatógeno (círculo).

- **Viabilidad**

De las suspensiones cosechadas en la variable esporulación, se uniformizaron las concentraciones de cada aislado hasta obtener una concentración de 30 a 300 esporas por mililitro de suspensión. Luego se tomó 0.1 ml de la misma de cada aislado y se colocó en una nueva caja Petri con medio de cultivo PDA, la dilución se dispersó en toda la superficie del medio con la ayuda de la espátula Drigalski, se selló y etiquetó, se obtuvieron tres cajas Petri por cada aislado (Figura 16).

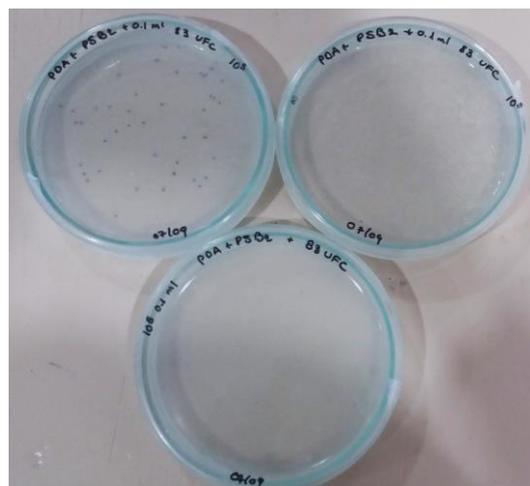


Figura 17. Concentración de esporas del hongo por mililitro de suspensión en cajas Petri

Los cultivos se incubaron en cuartos diferentes de acuerdo al tipo de hongo, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo: *Beauveria* spp. a 28 ± 2 °C, HR a

60 ± 5% y 6:18 h luz–oscuridad, *Paecilomyces* spp. a 28 ± 2 °C, HR de 60 ± 5%) y 5:19 h luz–oscuridad y *Metarhizium* sp. a 26 ± 2 °C, HR de 55± 5% y luz permanente durante tres días. Finalmente se observó la presencia de colonias o unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 18).



Figura 18. Unidades Formadoras de Colonias de los aislados entomopatógenos

Para registrar el número de colonias presentes y determinar el porcentaje de viabilidad se empleó la siguiente fórmula.

$$\%V = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias presentes}}{N^{\circ} \text{ de esporas sembradas}} \times 100$$

Donde:

% V= Porcentaje de viabilidad

3.3.2. Manejo del experimento

El aislamiento de los hongos entomopatógenos fue realizado en dos sitios de la finca Florisol, fuera y dentro del cultivo de crisantemo, para lo cual se realizaron las siguientes actividades:

3.3.2.1. Aislamiento a partir de muestras de la rizósfera

- **Recolección de la rizósfera**

Para el muestreo, se recolectaron 100 g de suelo de la rizósfera de cinco plantas de *Chrysanthemum* sp. (cada una 20 g), y de la planta *Alternanthera porrigens* Kuntze (moradilla)

la cual se encontró fuera del área del cultivo de crisantemo, esta toma fue realizada a una profundidad de 20 cm desde la superficie (Figura 19).



Figura 19. Recolección de muestra de rizósfera. a) planta de crisantemo, b) toma de muestra de la planta ornamental (moradilla) ubicada fuera del cultivo de crisantemo, c) muestras de los dos sitios, enfundadas y etiquetadas.

Las submuestras fueron llevadas al laboratorio en donde se mezclaron en una sola muestra, luego el suelo fue desintegrado, asegurándose que esté bien mullido, después se pesó 1 g de cada muestra para seguir con el siguiente proceso de aislamiento (Figura 20).



Figura 20. Muestras de cada sitio de recolección.

- **Diluciones seriadas**

Luego fue tomado 1 g del suelo tomadas de las rizósfera de la planta de crisantemo y moradilla para mezclarlo con 9 ml de agua destilada estéril contenidos en un tubo de ensayo, a esta

suspensión se le añadió Tween 20 al 0.05%, esta solución se colocó en el vórtex durante 30 segundos con la finalidad de homogenizar, se dejó reposar hasta que el suelo se sedimente en el fondo del tubo de ensayo, luego de esto se tomó 1 ml de esta suspensión y se transfirió a un nuevo tubo de ensayo que contenga 9 ml de agua destilada estéril para obtener una dilución 1/10 y de esta manera se repitió el proceso hasta obtener una dilución de 1/1000 (Figura 21).



Figura 21. Diluciones seriadas de la muestra de rizósfera

- **Aislar el hongo entomopatígeno**

Para el aislamiento de los hongos entomopatógenos, se tomaron 39 g del medio PDA y 0.08 g de Dodine (Syllit- fungicida) el que se disolvió en 1 l de agua destilada y se esterilizó en la autoclave a 121°C por 20 min y 20 bares de presión. Cuando el medio se encontraba a 60 °C se le añadió 2 ml de gentamicina. Seguidamente se esterilizaron 60 cajas Petri en la autoclave a 121°C por 40 min y 20 bares de presión, en las cuales fue transferido 20 ml del medio PDA (Figura 22) descrito anteriormente, de estas cajas 30 se utilizaron para aislar microorganismos del suelo y 30 para microorganismos de las hojas. Todo el material estéril se llevó a la cámara de flujo para proceder con las actividades a continuación.

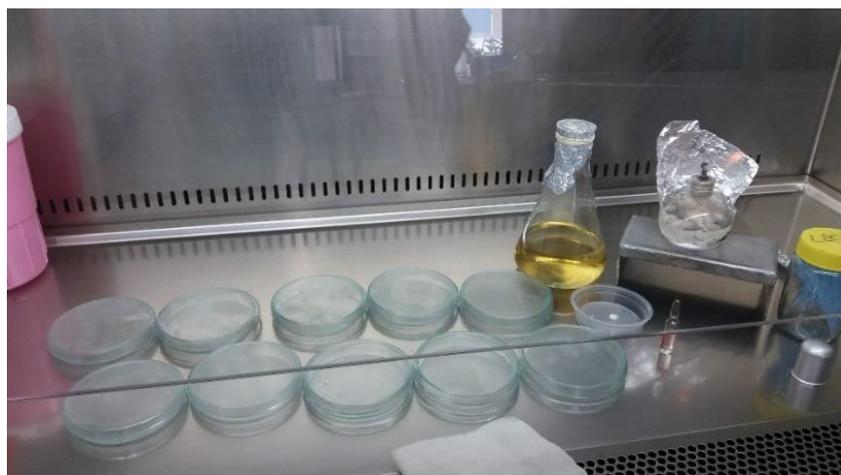


Figura 22. Material de trabajo para el aislamiento de microorganismo

Con la ayuda de una pipeta se tomaron 0.5 ml de la dilución de 1/1000 y se depositaron en la superficie de las 15 cajas Petri con el medio PDA descrito anteriormente. Con la ayuda de una espátula Drigalsky se esparció el cultivo sobre el medio, se selló con la cinta parafilm y se etiquetó cada caja Petri de acuerdo al lugar de procedencia. Finalmente fueron colocadas en la incubadora del laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura (30 ± 2 °C), humedad relativa (60%) y un fotoperiodo (12:12 h luz–oscuridad) durante tres días para obtener el crecimiento microbiano (Figura 23).

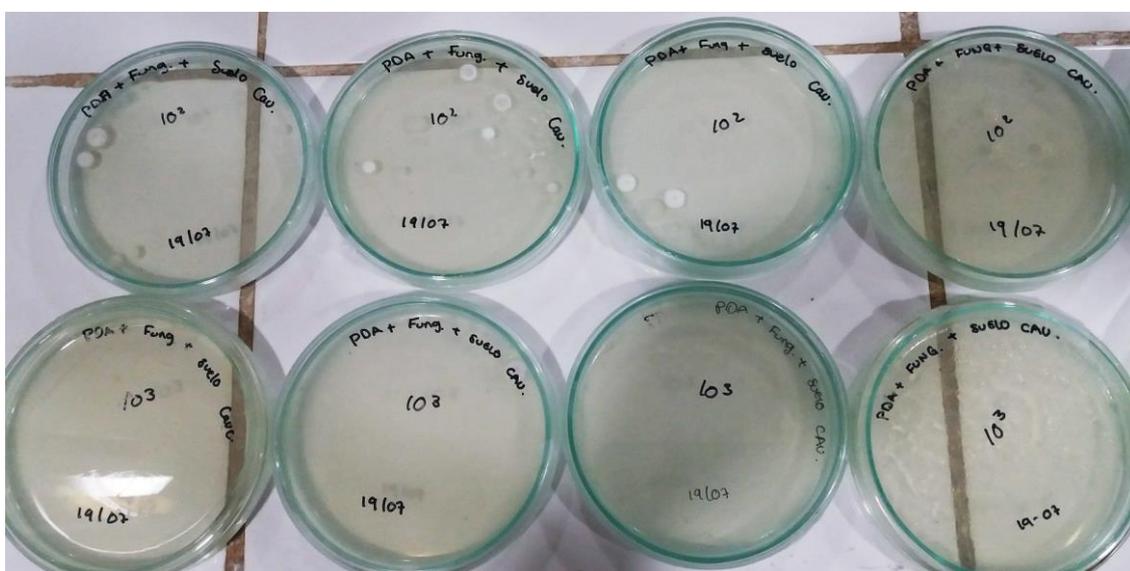


Figura 23. Crecimiento microbiano de la muestra del suelo

3.3.2.2. Aislamiento a partir de muestras de hojas

Recolección de hojas

En el campo se recolectó al azar 20 muestras de hojas de *Chrysanthemum* sp. y de una planta ornamental *Alternanthera porrigens* Kuntze libre de enfermedades y plagas, las cuales se colocaron en una funda hermética (Figura 24).



Figura 24. Plantas asintomáticas del estudio. a) planta de crisantemo, b) planta ornamental (moradilla).

Luego fueron llevadas al laboratorio para realizar el protocolo de desinfección, el cual se realizó de la siguiente manera: en primer lugar, las hojas se lavaron con agua potable y jabón de manos, luego se preparó una solución con agua destilada estéril más Tween 20 al 0.05% en la cual fueron sumergidas las hojas durante aproximadamente 5 min, se quitó el resto del Tween 20 con ADE, luego se preparó una solución con ADE y cloro al 5% en la que se sumergió las hojas durante 30 s, finalmente se lavaron tres veces con ADE con el objetivo de quitar los restos de cloro y se secaron con papel absorbente estéril.

- **Macerado de las hojas de crisantemo**

Con la ayuda de un mortero y pistilo estéril se procedió a macerar las hojas de crisantemo desinfectadas con ADE hasta obtener una solución, de la misma manera las hojas de moradilla. Este proceso se realizó en la cámara de flujo (Figura 25).



Figura 25. Macerado de las hojas recolectadas

- **Siembra de la solución del macerado de las hojas de crisantemo y moradilla**

Se tomaron 0.5 ml de la solución del macerado de la muestra y se sembró en cajas Petri de la forma descrita anteriormente, se dispersó la solución en la superficie del PDA con la ayuda de la espátula Drigalsky y se colocó en la incubadora del laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura (30 ± 2 °C), humedad relativa (60%) y un fotoperiodo (12:12 h luz–oscuridad) aproximadamente durante tres días (Figura 26).

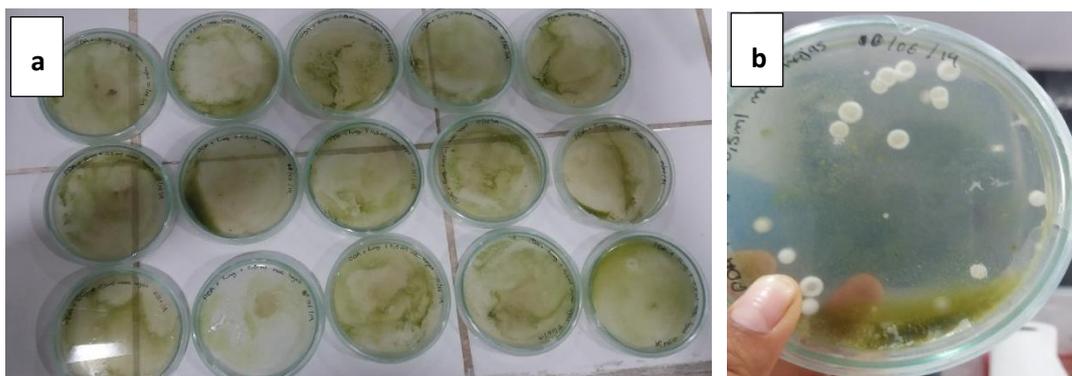


Figura 26. Siembra de la solución de muestras de hojas. a) 0.5 ml de solución en cajas Petri, b) presencia de microorganismos a las 72 horas.

Tanto de los cultivos de muestras de rizósfera como de las muestras de macerado de hoja, se realizó el repique de los microbios a nuevas cajas Petri con medio de cultivo PDA con el objetivo de obtener cultivos axénicos.

3.3.2.3. Identificación de los aislados entomopatógenos

Para la identificación de los hongos entomopatógenos se prepararon 39 g del medio PDA, 0.08 g de Syllit- fungicida y gentamicina (Anexo 3) se disolvieron en 1 l de agua destilada y se esterilizó en la autoclave a 121°C por 20 min y 20 bares de presión. Cuando el medio se encontró a 60 °C se añadieron 2 ml de gentamicina y fue transferido 20 ml del mismo en cajas Petri estériles.

Transcurridos los tres días, en las cajas Petri con las muestras recolectadas se observaron colonias de varios microorganismos e hifas (Figura 27), se replicó cada uno de ellos en medio PDA anteriormente detallado, mediante la técnica de estriado utilizando hisopos estériles, se selló y etiquetó con números de uno al 20. Luego se colocaron en la incubadora del laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura (30 ± 2 °C), humedad relativa (60%) y un fotoperiodo (12:12 h luz–oscuridad) durante cinco días.

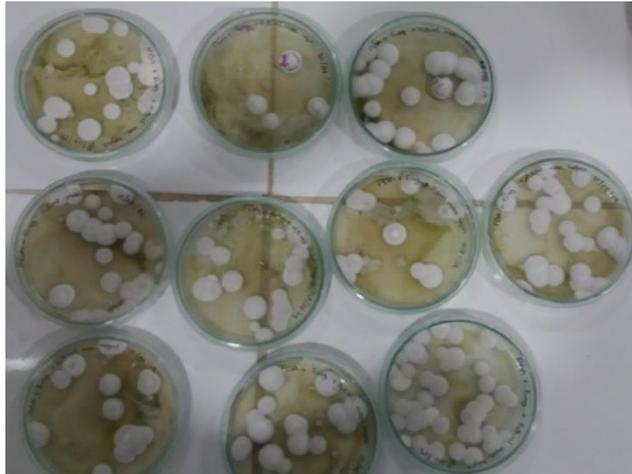


Figura 27. Diversidad de microorganismos del macerado de hojas

Se repitió el proceso del repique para realizar microscopia de cada uno de los microorganismos la cual consistió en tomar una muestra del hongo y observar en el microscopio de acuerdo al manual de (Cañedo y Ames, 2004) (Figura 28). Este proceso se realizó con la finalidad de diferenciar los hongos entomopatógenos de los demás microbios para esto se utilizó la guía Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y Hunter, 1972; Humber, 1998).

Una vez indentificados los supuestos hongos entomopatógenos se procedió a purificar estas cepas, mediante tres repiques. Una vez que el hongo estaba puro se observaron las características morfológicas para confirmar que es un hongo entomopatógeno de acuerdo a las guías anteriormente mencionadas.

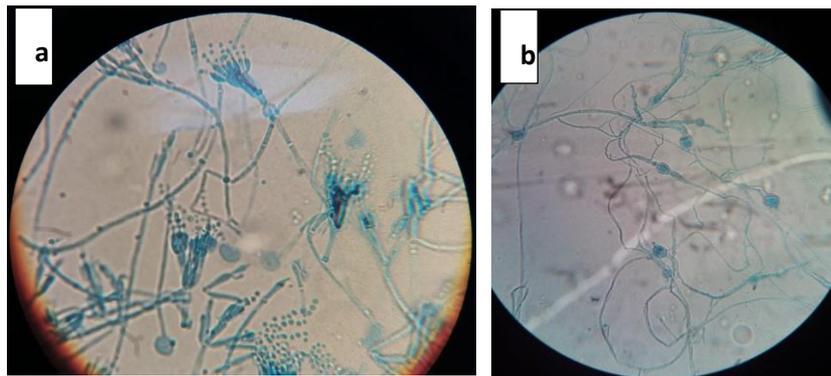


Figura 28. Microorganismos del macerado de hojas visto en el microscopio. a) hongo entomopatógeno de acuerdo a las características microscópicas (40X), b) hongo ambiental (40X).

3.3.2.4. Conservación de los aislados de hongos entomopatógenos

Los microbios aislados e identificados como hongos entomopatógenos se conservaron en frío a 0°C con el fin de poder utilizar las cepas a largo plazo, para lo cual se preparó una solución

al 10% de glicerol y skim milk al 8.5% y todo esto se esterilizó a 121°C durante 20 minutos (Figura 29).



Figura 29. Materiales para realizar el método de conservación en frío

Se esterilizaron 200 tubos eppendorf en la autoclave a 121°C por 40 min y 20 bares de presión, luego se colocaron los mismos en una gradilla y se agregó en cada uno de ellos 700 µl de la solución de glicerol, 700 µl de la solución de skim milk y un pedazo de medio con inóculo del hongo entomopatógeno puro tomados de las cajas Petri. Seguidamente se sellaron los tubos eppendorf con parafilm y se etiquetaron de acuerdo al tipo de hongo y el lugar de procedencia y fueron almacenados a 0°C (Figura 30).



Figura 30. Muestra que se procedió a conservar en frío

3.3.2.5. Caracterización de los aislados de hongos entomopatógenos

Para la variable crecimiento y viabilidad se utilizaron cinco unidades experimentales por aislado. Cada una estuvo constituida por una caja Petri con cultivo. Las unidades se distribuyeron de acuerdo a un diseño completo al azar. Para la variable esporulación, una sola suspensión la cual constituyó una unidad experimental por aislado. Los datos fueron tomados a simple vista y con el microscopio.

3.4. Fase experimental

3.4.1. Métodos

Esta investigación es de tipo experimental puesto que fue evaluada la eficiencia de aislados de hongos entomopatógenos para el control del insecto minador.

3.4.1.1. Factor en estudio

En esta investigación se planteó un factor con 10 niveles (Tabla 2).

- Factor: Aislados de hongos entomopatógenos

H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, T

Tabla 2

Niveles del factor (Dosis del hongo 10^6 UFC/ml)

Nivel	Código	Descripción
H1	BSC	<i>Beauveria</i> sp. suelo crisantemo
H2	BMHC	<i>Beauveria</i> sp. macerado hojas crisantemo
H3	BSB	<i>Beauveria</i> sp. suelo bosque
H4	BMHB	<i>Beauveria</i> sp. macerado hojas bosque
H5	MSB	<i>Metarhizium</i> sp. suelo bosque
H6	PSC	<i>Paecilomyces</i> sp. suelo crisantemo
H7	PMHC	<i>Paecilomyces</i> sp. macerado hojas crisantemo
H8	PMHB	<i>Paecilomyces</i> sp. macerado hojas bosque
H9	PSB	<i>Paecilomyces</i> sp. suelo bosque
H10	PSB1	<i>Paecilomyces</i> sp. suelo bosque 1
T	T	Testigo

3.4.1.2. Características del experimento

Bloques: 3

Niveles: 11

Total de unidades experimentales: 33

Área experimental: 3 m²

3.4.1.3. Característica de la unidad experimental

- Frascos de vidrio

Altura: 12.3 cm

Volumen: 360 cc

Cada unidad experimental contiene tres hojas de crisantemos esterilizadas por la superficie, cinco insectos *Liriomyza huidobrensis* B. y la solución del hongo entomopatógeno.

3.4.1.4. Diseño experimental

En esta investigación se utilizó el Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA) con tres bloques y tres cajas Petri por unidad experimental (Figura 31).

BSC	BMHC	BSB	BMHB	MSB	PSC	PMHC	PMHB	PSB	PSB1	T	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	B1
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	B2
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	B3
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	

Figura 31. Diseño experimental de la investigación

3.4.1.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 % en el software INFOSTAT versión 2018, se aplicó el modelo lineal general y mixto,

para las pruebas de media se utilizó LSD Fisher al 5%. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y de la homogeneidad de varianza que realizaron ajustes de datos y transformación (Tabla 3).

Tabla 3

Esquema del ADEVA para un diseño en bloques completos al azar (DBCA)

Fuentes de variación	GL
Bloque	2
Aislado de Hongo	10
Error	20
Total	32

3.4.1.6. Variable a evaluar

- **Porcentaje de mortalidad corregido de insectos minadores**

Se establecieron frascos de vidrio que contenían hojas de *Chrysanthemum* sp. esterilizadas, papel estéril humedecido, insectos minadores y aislados entomopatógenos, así como los controles (Figura 32).



Figura 32. Unidad experimental de la investigación

Al día de incubación de los frascos de vidrio se determinó el porcentaje de mortalidad corregido a través de la fórmula de Abbott (1988).

$$\%M = \frac{\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

Donde, %M representa el porcentaje de mortalidad corregido

En el día 10 también se determinó el porcentaje de insectos infestados con el hongo entomopatógeno.

3.4.2. Manejo del experimento

3.4.2.1. Cría del insecto minador

Se establecieron cámaras de cría del insecto minador bajo condiciones de invernadero, para lo cual se plantaron tejidos asintomáticos de crisantemo en maceteros que contenían suelo estéril, se obtuvieron alrededor de ocho maceteros (Figura 33).



Figura 33. Cámaras de cría del insecto minador

Desde el invernadero se recolectaron insectos adultos de minador y se colocaron alrededor de 10 insectos por macetero, luego se los cubrió con una jaula cubierta de tela para de esta manera obtener las cámaras de cría (Figura 34).

3.4.2.2. Bioensayos

- **Repique de aislados entomopatógenos**

Para los bioensayos, de cada aislado entomopatógeno del cultivo conservado se tomaron 200 μ l de solución y se colocaron en una caja Petri con medio PDA (cultivo madre), se procedió a sellar y etiquetar, luego se ubicaron en cuartos diferentes de acuerdo al tipo de hongo bajo condiciones controladas de temperatura, *Beauveria* spp. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa (HR) $60 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 6 h luz y 18 h oscuridad, *Paecilomyces* spp. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, HR de $60 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 5h luz y 19h, mientras que el hongo *Metarhizium* sp. se ubicó en una incubadora a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, HR de $58 \pm 5\%$ y luz permanente, durante siete días.

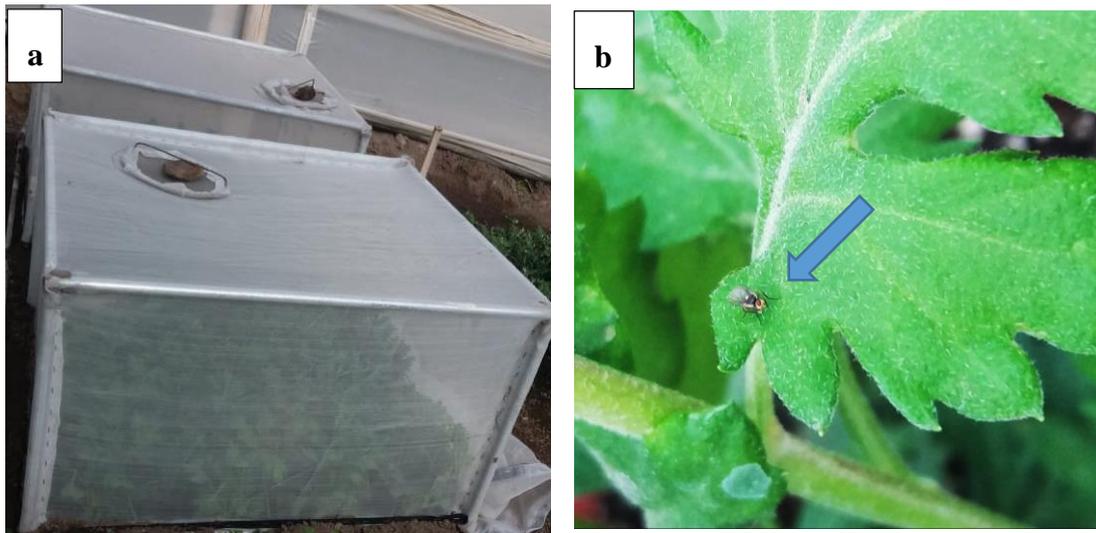


Figura 34. Cámaras de cría del insecto minador. a) cámaras de cría de la mosca minadora, b) *Liriomyza huidibrensis* Blanchard

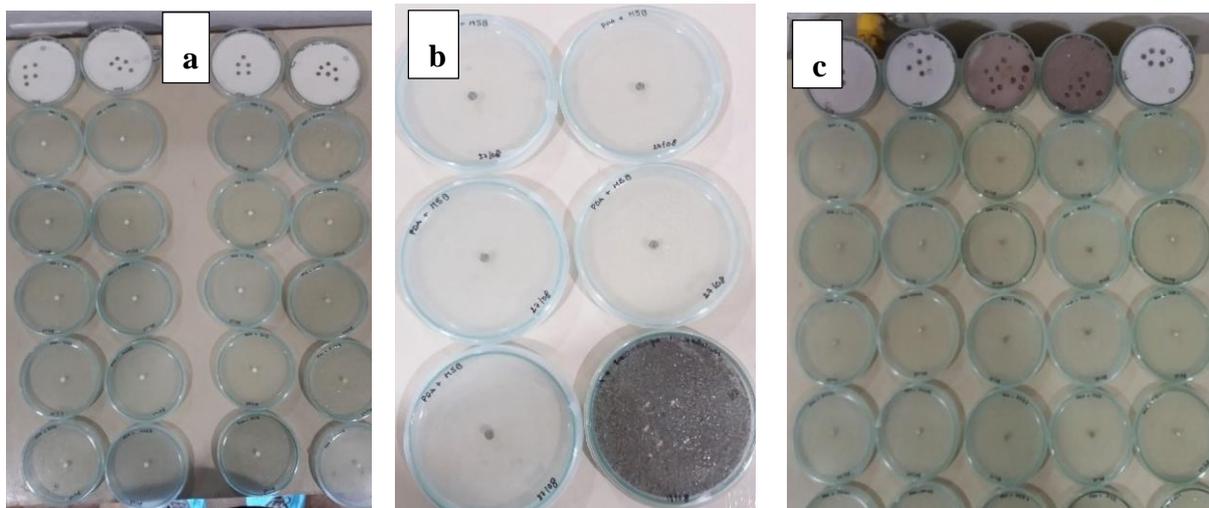


Figura 35. Réplica de los microorganismos entomopatógenos. a) repique del hongo *Beauveria* spp., b) repique del aislado *Metarhizium* sp., c) repique del hongo *Paecilomyces* spp.

Al séptimo día de incubación, se llevaron los hongos a la cámara de flujo, en donde se tomaron 0.5 cm del inóculo con un sacabocado estéril y se transfirió el mismo a una nueva caja Petri con medio PDA, se sellaron y etiquetaron, se obtuvieron un total de cinco cajas cultivadas por cada aislado. Finalmente se ubicó cada tipo de hongo en un cuarto bajo condiciones controladas anteriormente descritas (Figura 35).

- **Cosecha de las esporas**

Al día 15 de incubación de los aislados entomopatógenos, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril más 0.05% de Tween 20 a cada cultivo contenido en la caja Petri, luego con la ayuda de

hisopos estériles se cosecharon las esporas. La suspensión de conidios de cada aislado se filtró en una capa de gaza estéril y su concentración se determinó en la cámara Neubauer y se ajustó a 1×10^6 conidios/ml (Figura 36).



Figura 36. Cosecha de las esporas de los microorganismos aislados

- **Desinfección de las hojas de crisantemo**

En el laboratorio se procedió a realizar el protocolo de desinfección de las hojas asintomáticas de crisantemo, esto consistió en lavar en agua potable, luego bajo condiciones estériles se mantuvo en hipoclorito de sodio al 0.2% durante 3 min, posteriormente se lavaron tres veces en agua destilada estéril con la finalidad de quitar los restos del cloro. Seguidamente, en un frasco de vidrio que contenía dos láminas de papel absorbente de celulosa estériles en su base interna humedecidas con 1 ml de ADE se colocaron tres hojas estériles de crisantemo y se obtuvieron un total de nueve frascos por cada aislado.

- **Colocación de los insectos adultos *Liriomyza huidobrensis* Blanchard en cada bioensayo**

Seguidamente dentro de cada frasco de vidrio se colocaron cinco insectos adultos provenientes de las cámaras de cría del invernadero, para luego cubrir el frasco con una malla antiáfidos y sujetarlo con una liga estéril.

- **Inoculación de los aislados de hongos entomopatógenos en cada bioensayo**

Mediante la técnica de aspersión se añadieron 1 ml de la suspensión 1×10^6 conidios/ml a los insectos de cada uno de los frascos de vidrio, el tratamiento testigo estaba constituido por 1 ml

de agua destilada estéril, papel absorbente, hojas de crisantemo estéril y el insecto minador (Figura 37).

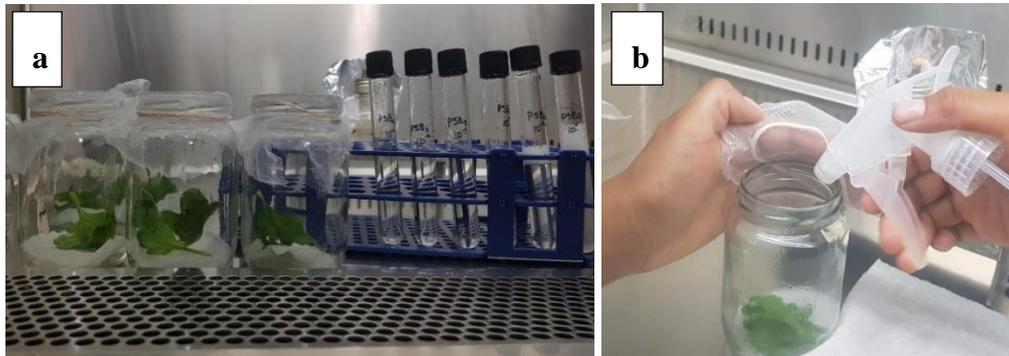


Figura 37. Inoculación del aislado entomopatógeno en los bioensayos. a) bioensayos con hojas de crisantemo, papel absorbente, ADE, insecto minador y las diluciones seriadas (1 a 10^6 conidios/ml), mientras, b) método de aplicación de aislado entomopatógeno a cada bioensayo (1 ml por frasco de vidrio).

Seguidamente se colocaron en un cuarto bajo condiciones controladas de temperatura (25 ± 2 °C), humedad relativa ($55 \pm 5\%$) y un fotoperiodo (12:12 h luz–oscuridad) durante 10 días (Figura 38). Diariamente se llevó un registro de la mortalidad e infestación de los insectos.



Figura 38. Bioensayo de la investigación

- **Determinación del porcentaje de mortalidad corregida de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard**

Al día 10 de incubación se determinó el porcentaje de mortalidad de insectos minadores, el cual fue corregido de acuerdo a la fórmula de Abbott (AÑO): $((\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}) / (100 - \% \text{ mortalidad testigo})) \times 100$. Seguidamente, los insectos muertos

con y sin micosis (Figura 39) fueron esterilizados en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 3 minutos luego lavados tres veces en agua destilada estéril para luego ser colocados en cámaras de esporulación para aislar el hongo inoculado y confirmar la muerte por infección del hongo.

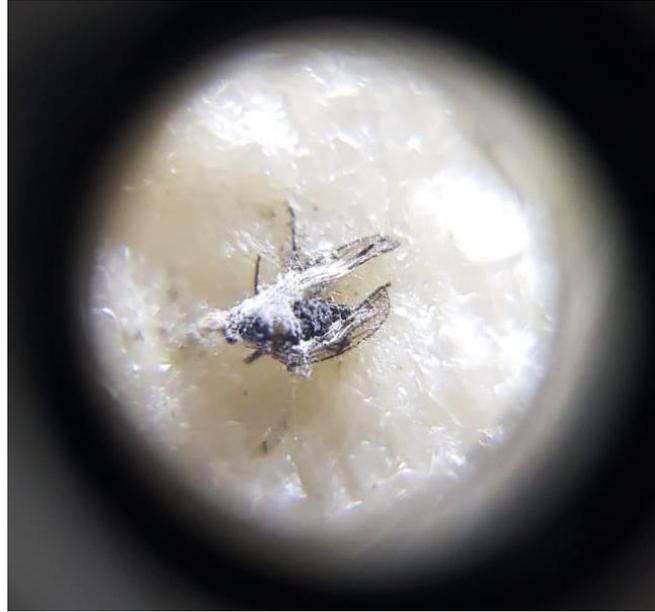


Figura 39. Insecto muerto e infestado

La evaluación de cada hongo entomopatógeno se realizó mediante la aplicación por aspersion de la dilución 1×10^6 conidios/ml de cada aislado dentro de la unidad experimental (frasco de vidrio + hojas de crisantemo + papel absorbente + insecto adulto) y todos los frascos se colocaron en un ambiente con las siguientes condiciones $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y 55% HR. El control se realizó diariamente a simple vista y con el estereoscopio.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó en dos fases: fase descriptiva la cual hace referencia al aislamiento y caracterización de los caracteres cuantitativos y cualitativos de los hongos entomopatógenos y la fase experimental se trata de la mortalidad e infestación del insecto minador a causa del hongo aplicado.

4.1. Identificación de los aislados entomopatógenos

En el proceso de determinación y caracterización de la diversidad de hongos entomopatógenos en el cultivo de crisantemos, que corresponde a la fase uno de la investigación, se trabajó en la identificación de 10 cepas de microorganismos benéficos que son cuatro de *Beauveria* spp., cinco de *Paecilomyces* spp. y uno de *Metarhizium* sp. para lo cual se aplicaron los protocolos de aislamiento para dos tipos suelo (cultivo y bosque) y macerado de hojas (crisantemo y moradilla).

4.1.1. *Beauveria* spp.

En el presente ítem se presenta una comparación morfológica entre los aislados para el género *Beauveria bassiana* B. Los aislados de *Beauveria* spp. presentan uniformidad concéntrica en el crecimiento, primera característica que hay que tomar en cuenta para la descripción morfológica de este entomopatógeno, después y de manera conjunta con la expansión se va desarrollando una constitución algodonosa aterciopelada de color blanco, esto implica la conformación de los conidióforos. Después que el crecimiento radial alcanza las paredes de la caja Petri y el hongo no puede seguir expandiéndose, la textura algodonosa y aterciopelada pierde volumen que viene desde la parte central, esta configuración se da porque el microorganismo ha superado la fase de esporulación y los conidióforos se asientan. Todas estas características morfológicas se cumplen en los cuatro aislados presentes en las figuras y de esta forma podemos determinar que se trata del género *Beauveria* spp. (Figura 40).

Según Echeverría (2006), los aislados de *Beauveria bassiana* B. muestran crecimiento en forma expansiva y homogénea alrededor del círculo inoculado de un color blanco completamente predominante (Figura 41); también se pueden presentar crecimientos que no mantienen uniformidad, esto se da porque en el momento de manipular el inóculo hay esporas que se desprenden y pueden modificar la concentricidad.

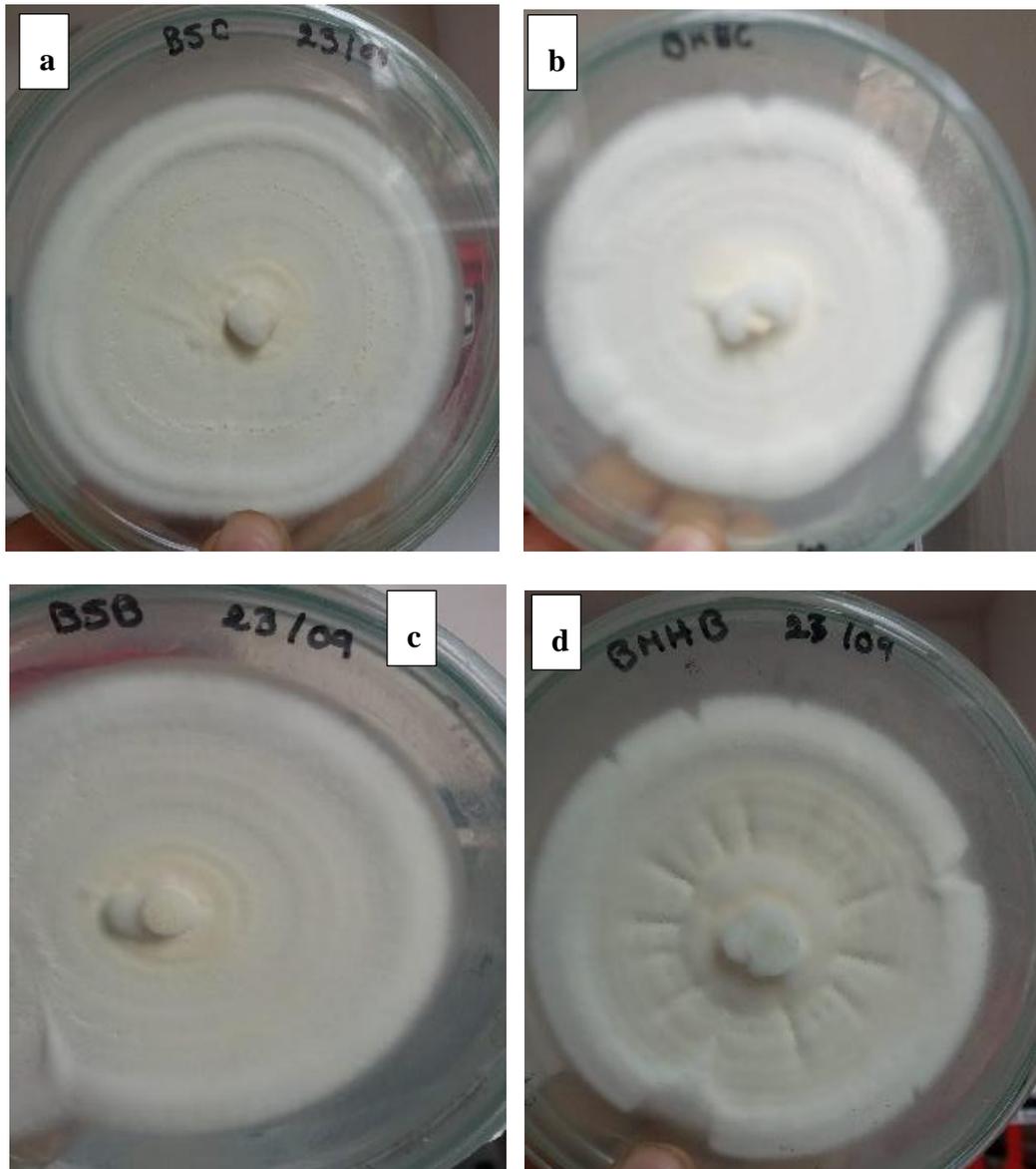


Figura 40. Cultivo in vitro de *Beauveria* spp. aislado de a) suelo crisantemo, b) macerado hojas crisantemo, c) suelo bosque y d) macerado de hojas bosque.

4.1.2. *Metarhizium* sp.

En la figura 42 se puede observar con claridad el desarrollo del crecimiento de aislamientos de *Metarhizium* sp. de siete y 15 días, en donde el microorganismo presenta un rápido cambio de color entre el blanco y el verde oliva oscuro. Estos cambios de coloración se generan porque, en inicio el entomopatógeno desarrolla un crecimiento de color blanco y genera a la par los conidióforos que mantienen gran actividad de desprendimientos de esporas, las cuales caen alrededor del crecimiento y existe una nueva generación del hongo, mientras que las hifas que emitieron las esporas se deshidratan y cambian de color, por tal motivo siempre el crecimiento

de este orden mantendrá una coloración blanco intenso mientras alcanza las paredes de la caja Petri.



Figura 41. Cultivo in vitro de *Beauveria bassiana*

Fuente: Echeverría (2006)

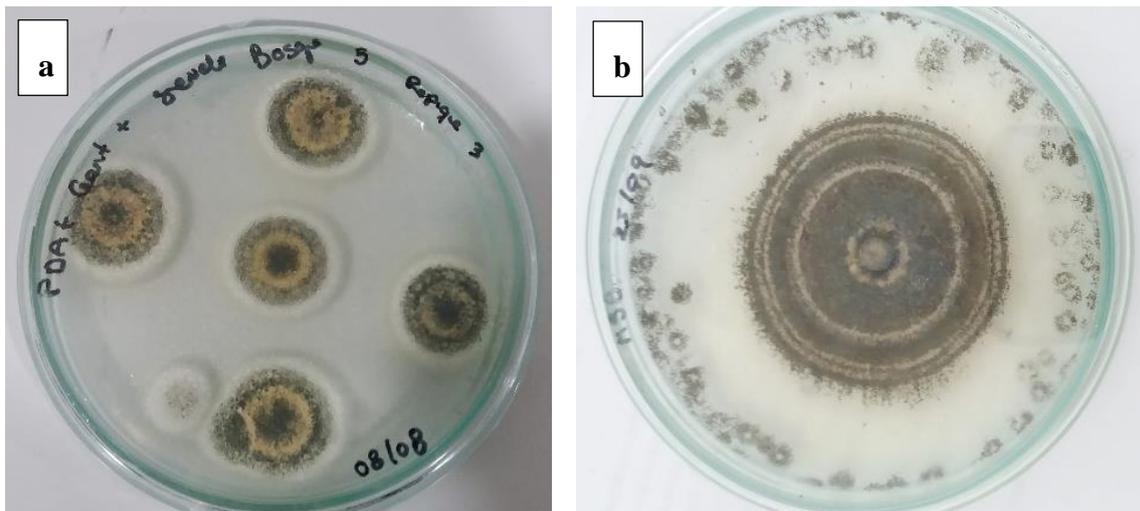


Figura 42. Cultivo in vitro de *Metarhizium* sp. obtenido de una muestra de la rizósfera de moradilla. a) cultivo de *Metarhizium* sp. de siete días, b) aislado del género *Metarhizium* de 15 días

Lo anterior coincide con la descripción que realizan Gato et al., 2016 quienes informan que las colonias del complejo de especies de *Metarhizium* son inicialmente blancas, algodonosas y amarillas durante el desarrollo temprano de los conidios (típicamente de 4-7 días), micelio blanco hacia el borde regular de la colonia y se torna verde olivo intenso con la esporulación, también obtuvieron crecimientos promedios de 7.4 cm de diámetro (Figura 43).



Figura 43.. Cultivo in vitro de *Metarhizium anisopliae* Metschn

Fuente: Gato et al. (2016)

4.1.2. *Paecilomyces* spp.

El aislamiento de *Paecilomyces* spp., en medio PDA incubado a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de $60 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 5h luz y 19h oscuridad, durante 15 días presentó colonias de crecimiento acelerado, pigmentación blanco liliáceo, borde regular, consistencia algodonosa con elevaciones en forma de círculos, aspecto esponjoso y en el reverso de la caja Petri se observa un color café con bordes blanquecinos (Figura 44). Estas características concuerdan con lo mencionado por Almaraz et al (2012), Ardila (2013) y Figueroa, Ramírez y Sigarroa (2013).

Según Almaraz, Alvarado, Tlapal y Espinoza (2012) las colonias del género *Paecilomyces* son planas y polvosas y de textura aterciopeladas, el color es inicialmente blanco y luego se pueden tornar en diferentes tonalidades que van desde el amarillo, amarillo café, violeta, violeta café, o rosada, esto dependerá mucho de la especie. El reverso de la colonia puede ser blanco sucio (Figura 45). Los cuales son similares a las características observadas en la presente investigación.

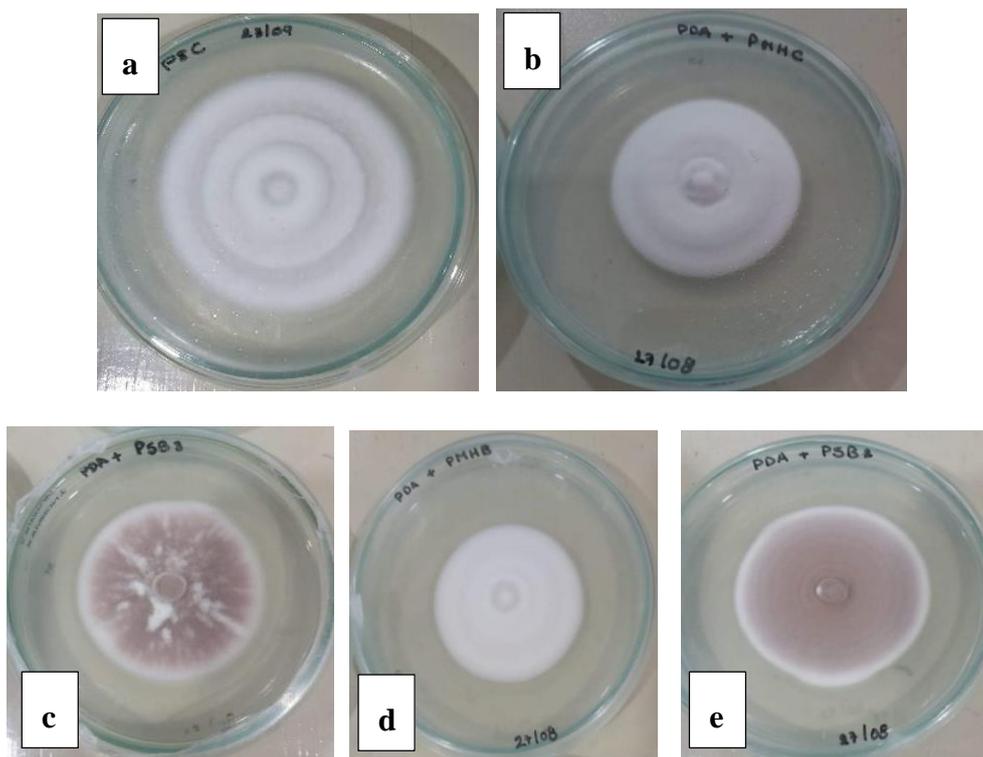


Figura 44. Cultivo *in vitro* de *Paecilomyces* spp obtenido de tres muestras de suelo y dos macerados de hojas de planta crisantemo y moradilla: a) rizósfera del crisantemo, b) macerado de hojas de crisantemo, c, e) rizósfera de *Alternanthera porrigens* Kuntze, d) macerado de hojas de *Alternanthera porrigens* Kuntze.



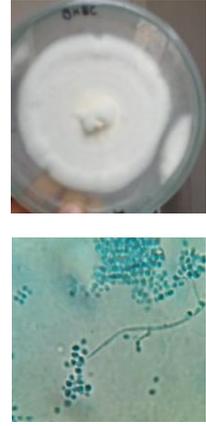
Figura 45. Cultivo *in vitro* de *Paecilomyces* sp.

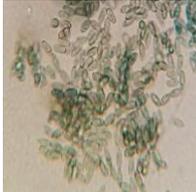
Fuente: Almaraz et al. (2012)

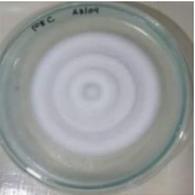
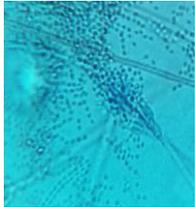
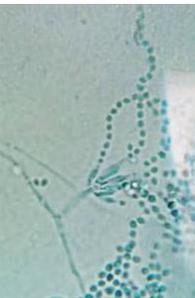
4.2. Caracterización morfológica

Los microorganismos aislados mostraron variabilidad entre ellos en cuanto a las características macroscópicas, microscópicas, cualitativas y cuantitativas (Tabla 4). Se observaron diferencias en cada una de las colonias en cuanto al color, aspecto, forma, borde, forma de los conidios, células codiógenas, entre otros.

Tabla 4*Características morfológica y cultural de los hongos aislados*

Origen	Claves	Identificación	Características macroscópicas	Características microscópicas	Foto
Rizósfera de <i>Chrysanthemum</i> L.	BSC	<i>Beauveria</i> sp.	Colonia ovalada, de aspecto polvoriento, color blanco-amarillento y en el reverso color amarillo pálido.	Conidios subgloboso, agrupados en forma de racimos; célula conidiógena cortas.	
Macerado hojas de <i>Chrysanthemum</i> L.	BMHC	<i>Beauveria</i> sp.	Colonia circular, aspecto compacto, Color blanco crema claro y en el reverso amarillo crema.	Conidios subgloboso; célula conidiógena cortas, suaves con cabezas de conidios difusos.	

<p>Rizósfera de <i>Alternanthera porrigens</i> Kuntze</p>	<p>BSB</p>	<p><i>Beauveria</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto polvoriento, color blanco beige y reverso amarillo.</p>	<p>Conidios globosos; conidióforo largas, con cabezas de conidios difusos.</p>	 
<p>Macerado hojas de <i>Alternanthera porrigens</i> Kuntze</p>	<p>BMHB</p>	<p><i>Beauveria</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto polvoriento, color blanco beige claro y en reverso amarillo crema y estrellada.</p>	<p>Conidios globosos en forma de racimos; células conidiogénicas cortas, incoloras.</p>	 
<p>Rizósfera de <i>Alternanthera porrigens</i> Kuntze</p>	<p>MSB</p>	<p><i>Metarhizium</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto polvoriento, color amarillo verdoso y en reverso amarillo claro.</p>	<p>Conidios alargados; filídes en forma de botella; conidióforo septado.</p>	 

<p>Rizósfera de <i>Chrysanthemum</i> L.</p>	<p>PSC</p>	<p><i>Paecilomyces</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto esponjoso, color violeta gris, reverso café claro.</p>	<p>Conidios ovoides en cadena; fiálides en forma de botella; conidióforo largo, incoloro.</p>	 
<p>Macerado hojas de <i>Chrysanthemum</i> L.</p>	<p>PMHC</p>	<p><i>Paecilomyces</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto esponjoso, color rosa gris y reverso amarillo.</p>	<p>Conidios redondos; fiálides separados; conidióforo corto, áspero, coloreado.</p>	 
<p>Macerado hojas de <i>Alternanthera porrigens</i></p>	<p>PMHB</p>	<p><i>Paecilomyces</i> sp.</p>	<p>Colonias circulares, aspecto esponjoso, color violeta gris y reverso café oscuro.</p>	<p>Conidios redondos en cadena, fiálides en forma de pétalos; conidióforo corto, áspero.</p>	 

Rizósfera de <i>Alternanthera porrigens</i>	PSB	<i>Paecilomyces</i> sp.	Colonias ovaladas, aspecto compacto, color marrón y el reverso color café oscuro.	Conidios ovoide dispersos; fiálides difusas; conidióforo largo, suave.	 
Rizósfera de <i>Alternanthera porrigens</i>	PSB1	<i>Paecilomyces</i> sp.	Colonias circulares, aspecto esponjoso, color rosa marrón, reverso oscuro.	Conidios ovoide, ubicados en cadena; fiálides en forma de botella; conidióforo largo, incoloro.	 

4.3. Diversidad de Hongos Entomopatógenos

Para determinar la similitud entre los diferentes aislados de hongos entomopatógenos se generó un dendrograma con base en los 11 niveles que corresponden a tres géneros de entomopatógenos. Como resultado se han conformado 6 conglomerados (Figura 46) que serán descritos a continuación.

- a) **Grupo I**, este segmento lo integran dos tipos de aislados que pertenecen al género *Beauveria* que se obtuvieron a partir de las muestras de hojas tanto de bosque como de crisantemo, los cuales mantienen una expansión uniforme y predomina un blanco intenso, con textura compacta y polvorienta en donde se distinguen las esporas con gran actividad de esporulación.

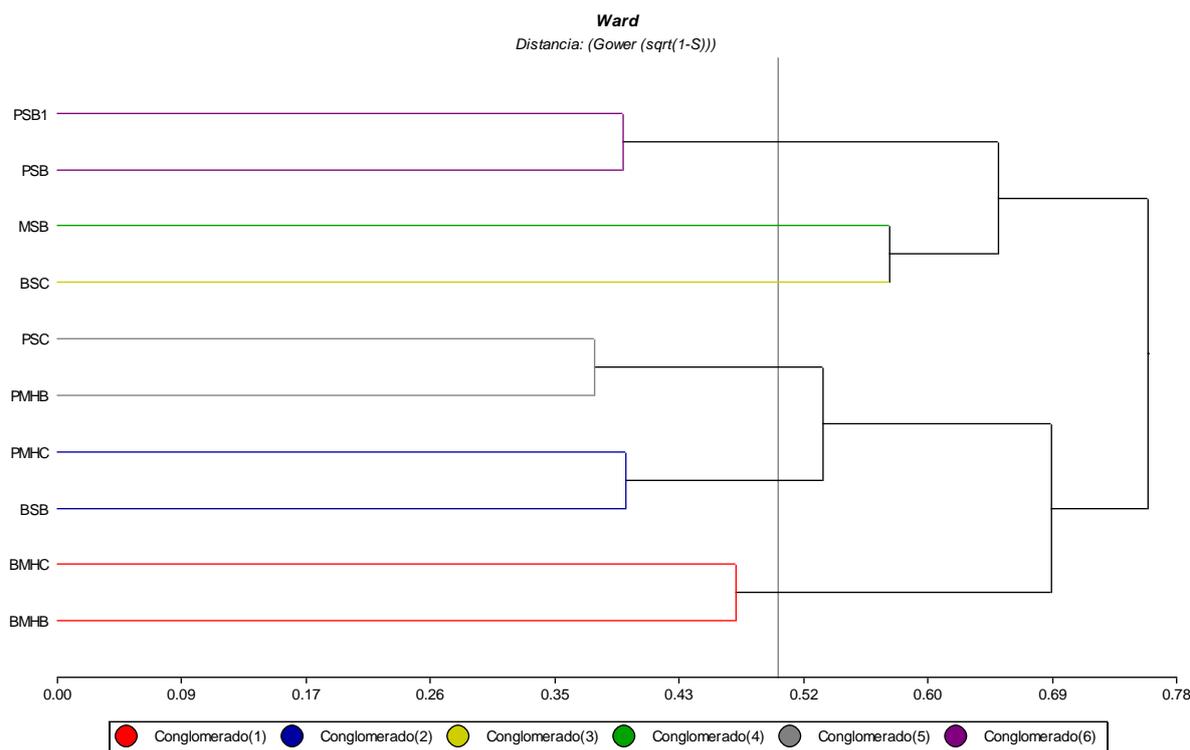


Figura 46. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados para las variables cuantitativas de 10 aislados de hongos entomopatógenos compuestos por tres géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*

- b) Grupo 2,** Este conjunto está integrado por dos niveles: *Beauveria* sp. aislada a partir de muestras de suelo bosque y *Paecilomyces* sp. obtenido de macerado de hojas de crisantemo; este conglomerado está caracterizado por su expansión de forma regular, al reverso estrellada, con desarrollo de hifas principalmente en los bordes, lo que le da una apariencia blanca algodonosa, tras este borde la textura del crecimiento se vuelve ligeramente aterciopelado, superando rápidamente la fase de esporulación lo cual coincide con las observaciones de Vela, Pineda, Duarte, Soto, y Pineda (2018). *Paecilomyces* sp. presenta una coloración blanquecina.
- c) Grupo 3.** Este segmento está representado solo por una accesión y corresponde a *Beauveria* sp. aislado a partir de muestras de suelo de crisantemo, el cual presenta un color frontal blanco crema, forma ovalada y en el reverso amarillo ligero, el aspecto del borde es compacto y su aspecto en general es polvoriento.
- d) Grupo 4.** En este conglomerado se encuentra el microorganismo *Metarhizium* sp. proveniente de suelo de bosque, en donde el crecimiento muestra una coloración amarillo-verdoso, el aspecto es más aterciopelado que algodonoso, caracterizado como

polvoriento con borde compacto, estas características coinciden con lo mencionado por (Aguilera et al., 2020).

- e) **Grupo 5.** Aquí se ubican dos aislados diferentes que corresponde a *Paecilomyces* sp. obtenido de suelo de crisantemo y macerado de hojas de bosque. Este conjunto se caracteriza por presentar una forma frontal regular, y al reverso circular, el color característico es el violeta gris en tanto que el reverso es café oscuro, los bordes se caracterizan por presentar un color blanco y aspecto semielevado y elevado y la forma del crecimiento radial es esponjoso.
- f) **Grupo 6.** Este grupo está conformado por los aislamientos del género *Paecilomyces* provenientes de las dos muestras de bosque; la forma frontal de este conglomerado ovalado disperso, el color frontal es blanco en tanto el reverso es amarillento, el borde se caracteriza por una coloración transparente y su aspecto es elevado y la expansión radial denota compactación.

4.4. Crecimiento

En la tabla 5 se observa el ANEVA para la variable crecimiento de los hongos entomopatógenos, en donde existe diferencias estadísticas ($F=663.01$; $gl= 9$; $P <0.0001$), por lo que se puede determinar el crecimiento es indistinto para cada aislado.

Tabla 5

Análisis de la Varianza (SC tipo III) para crecimiento

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor-P
Modelo	1075.20	9	119.47	663.01	<0.0001
Hongo	1075.20	9	119.47	663.01	<0.0001
Error	3.60	20	0.18		
Total	1078.81	29			

La figura 47 muestra la depreciación en el crecimiento de los aislados, en donde se observa la conformación de ocho rangos, de los cuales con mayor crecimiento destaca *Paecilomyces* sp.

proveniente de las dos muestras de suelo de bosque (40 mm), las cuales consiguieron el doble de expansión con respecto de *Metarhizium* sp. que resultó con el menor crecimiento 18.18 mm. En cuanto a *Paecilomyces* sp. se obtuvo un promedio de 2.7 mm/día, frente a esto Chan et al. (2010) encontró resultados inferiores de 1.63, 1.40 y 1.35 mm/día a través de muestras provenientes de los adultos de *B. tabaci* G.; García, García, Vejar, Meza, y Chávez, 2020 estudió el crecimiento del género de *Metarhizium* utilizando el medio de cultivo PDA + polvo de lepidópteros logrando una mayor expansión de 2.62 ± 0.08 mm/día superando los resultados del presente estudio 1.2 mm/día.

El segundo rango con mejor crecimiento corresponde a *Paecilomyces* sp. proveniente de hojas de bosque (37.97 mm), el cual no difiere del aislado del mismo microorganismo proveniente del suelo del cultivo de crisantemo (37.53 mm); el siguiente rango corresponde nuevamente al género *Paecilomyces* sp. pero resultante de las hojas de crisantemo, entonces podemos afirmar que el entomopatógeno *Paecilomyces* spp. mantiene los crecimientos más amplios, puesto que sus cinco niveles comparten los rangos más largos.

En tanto que el género *Beauveria* con sus cuatro niveles conforman tres rangos, siendo el mejor aislado el que proviene de la muestra de hojas de bosque (36.4 mm), el cual no difiere estadísticamente del nivel más bajo de *Paecilomyces* sp. (36.9 mm), seguidamente se ubican las muestras aisladas de suelo (34.5 mm) y hojas (34 mm) de crisantemo, las cuales conforman un solo rango y finalmente el nivel con menor crecimiento para *Beauveria* sp. fue el resultante de la muestra de suelo (33.2 mm). En un estudio realizado por Elósegui, Jiménez y Carr (2006) encontraron resultados similares sobre el crecimiento de la cepa de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. LBb-1 obtenidos a partir de especies de insectos, utilizando dos tipos del medio de cultivo PDA y Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), logrando resultados de 34 ± 2 mm y 32 ± 3 mm respectivamente para las variantes del agar.

En tanto que Ruiz et al. (2011) estudiaron el crecimiento radial de cinco cepas de *Metarhizium*, sp. nativas del Estado de Yucatán – México, obtenidos de un insecto, para lo cual utilizaron el medio de cultivo SDA incubándose en laboratorio a $27 \pm 3^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperíodos de 14 h luz/10 h oscuridad, obteniendo los siguientes resultados 34 mm a 37 mm que conformaron un solo rango en cuatro de las cinco cepas; en tanto que en el presente estudio *Metarhizium* sp. obtuvo el crecimiento más bajo y difiere considerablemente del anterior autor siendo hasta un 51% inferior.

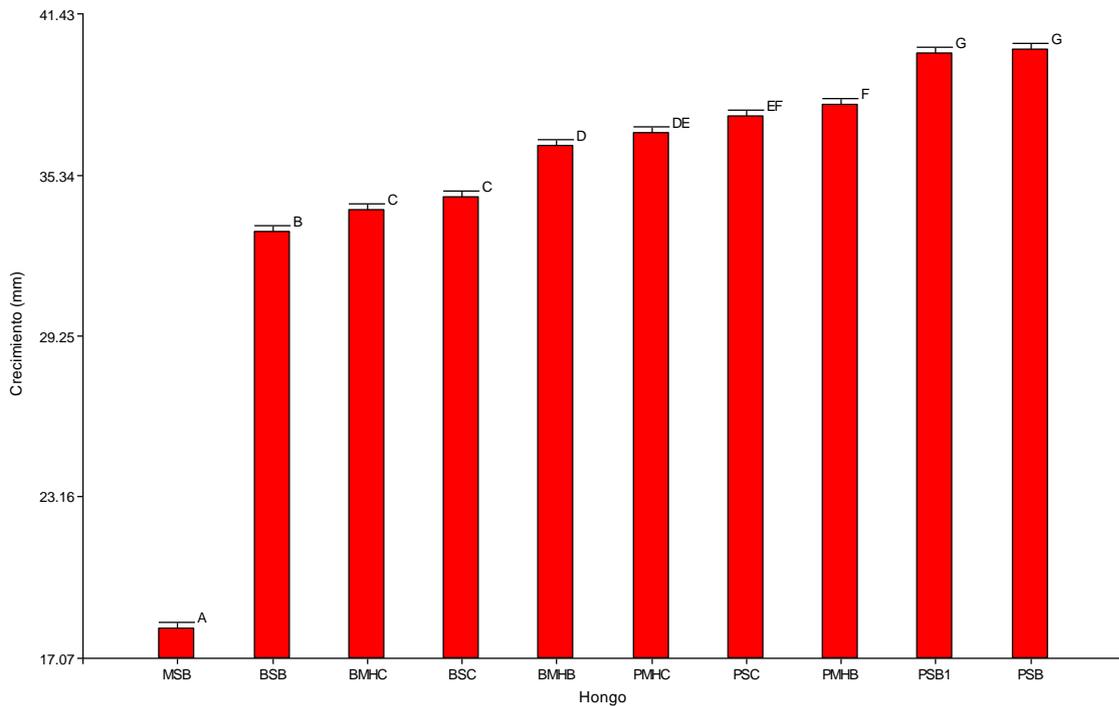


Figura 47. Crecimiento de las colonias de tres géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*

En cuanto, al medio de cultivo, al utilizar SDA se obtuvo un mayor crecimiento. En efecto el SDA contiene dextrosa, agar, peptonas, y a su vez es rico en carbohidratos, siendo favorable para su desarrollo, por el contrario, el PDA únicamente contiene trozos de papa con cáscaras, dextrosa y agar, lo cual no favorece al incremento del hongo *Metarhizium* sp. (Narrea y Malparida, 2006; Raymundo, García, López y Yakovleva, 2019). Es por eso que se obtuvo un menor crecimiento ya que en el presente estudio se utilizó el medio de cultivo PDA.

Chan et al. (2010) reportan el crecimiento *Paecilomyces fumosoroseus* con medio de cultivo SDA con 1 μ l de la suspensión de 1×10^7 esporas/ml. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 24 ± 3 °C, humedad relativa de $72 \pm 5\%$ y fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad, durante 15 días, en donde registro el mejor crecimiento con 37.5 mm, el cual coincide con el aislado del suelo de crisantemo del presente estudio, pero el mejor aislado de esta investigación obtuvo 40.08 mm lo cual difiere en aproximadamente 7%.

4.5. Esporulación

El ANOVA para la variable esporulación está disponible en la tabla 6, en donde se evidencia que existe diferencias significativas ($F= 26.48$; $Gl= 9$; $P < 0.0001$) y se determina que esta variable es distinta en al menos uno de los microorganismos entomopatógenos estudiados en la presente investigación.

Tabla 6

Análisis de la Varianza (SC tipo III) para esporulación

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor-P
Modelo	1,25E+32	9	1,3939E+17	26.48	<0.0001
Hongo	1,25E+32	9	1,3939E+17	26.48	<0.0001
Error	1,05274E+17	20	5,26372E+15		
Total	1,36E+29	29			

En la figura 48, se puede apreciar que la prueba de LSD Fisher al 5% determina la conformación de cinco grupos homogéneos, en donde destaca el nivel PSB1 siendo el de mayor y PMHC el de menor esporulación, lo que podría inferir que este proceso estaría relacionado al tipo de muestra.

Después se aprecia la conformación de un rango con tres niveles, conformado por dos aislados de *Beauveria* spp. (BMHB y BSC) y uno de *Paecilomyces* sp. (PSB), los cuales difieren hasta en un 63% del nivel con mayor esporulación (PSB1). El tercer grupo está representado por el nivel BMHC quien no difiere estadísticamente de las muestras de *Paecilomyces* spp. (PMHB, PSC) y *Beauveria* sp. (BSB) que a su vez conforman el cuarto rango y difieren entre 75% y 91% del nivel PSB1 que es el de mayor esporulación.

El rango con menor esporulación está conformado por dos niveles, *Metarhizium* sp. aislado desde muestras de suelo de bosque y *Paecilomyces* sp. proveniente de macerado de hojas de crisantemos. La diferencia con respecto de *Paecilomyces* sp. aislado a partir de muestras de suelo de bosque (PSB1), la diferencia es de aproximadamente del 95%

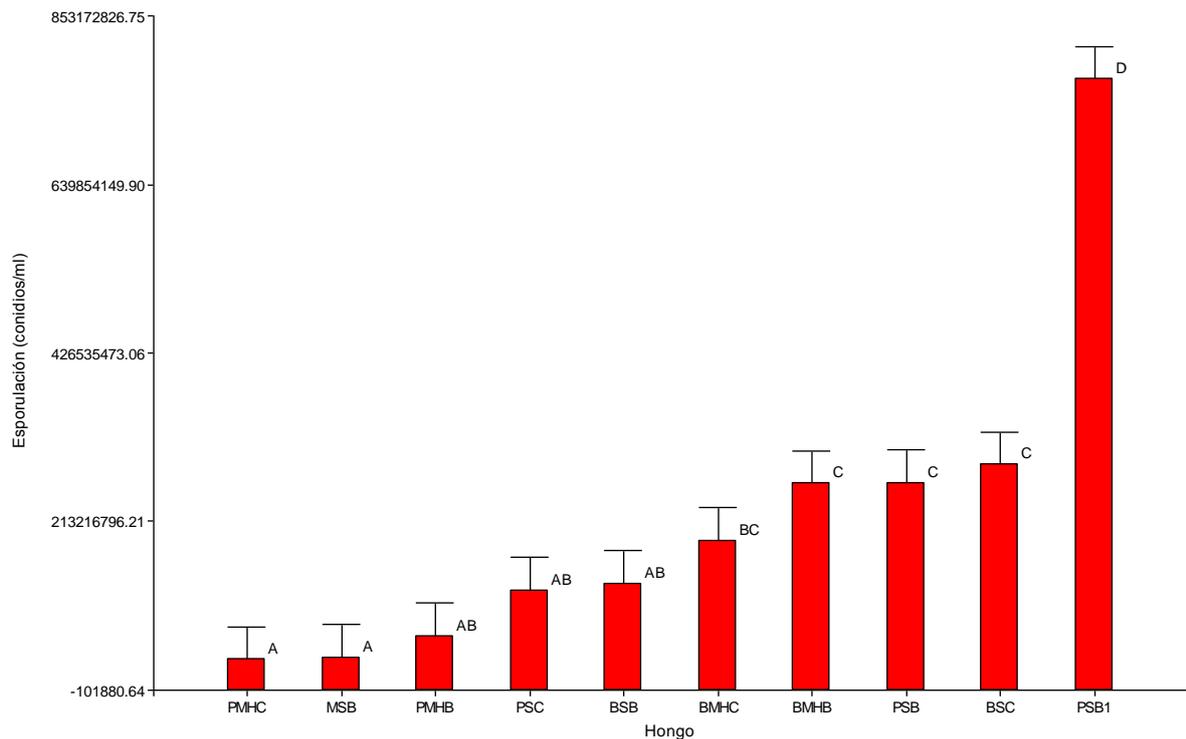


Figura 48. Esporulación de tres géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* Ruiz et al. (2011) en su estudio para esporulación de *Metarhizium* sp. obtuvo en su mejor tratamiento valores que está en el orden de los 8.56×10^6 conidios/ml utilizando *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* sobre SDA a 26 °C. Estos resultados distan de los resultados en la presente investigación, en donde esta variable alcanzó a 4.05×10^7 conidios/ml, la diferencia sería de aproximadamente del 80% a favor del presente estudio.

Elósegui et al. (2006) reportan la esporulación de *Beauveria bassiana* en el medio de cultivo SDA en valores que van desde los 4×10^8 a 1×10^9 conidios/ml, siendo estos superiores a los conseguidos en el presente trabajo, en donde el valor más alto conseguido en Chavezpamba corresponde 2.86×10^8 conidios/ml, cifra que llega a cuadruplicar el valor más elevado del anterior estudio; en tanto que el valor más bajo de la investigación citada es hasta un 20% superior con el resultado obtenido por el nivel BSC (2.86×10^8 conidios/ml).

En el estudio que se incluía el análisis de esporulación para *Paecilomyces fumosoroseus*, Chan et al. (2010) comunican que esta variable obtuvo resultados en el orden 4.55×10^6 conidios/ml para su mejor tratamiento, valores notablemente inferiores a los mostrados por la presente investigación, puesto que la esporulación más alta fue para el nivel PSB1 que llegó a 7.73×10^8 conidios/ml, siendo hasta 170 veces superior.

4.5. Viabilidad (%)

La variable viabilidad presenta diferencias estadísticas ($F= 22.66$; $Gl= 9$; $P < 0.0001$) para los tres géneros de hongos entomopatógenos estudiados, en donde se puede determinar que los valores se comportan indistintamente y se podría relacionar que esto se debe principalmente al origen de la muestra para el aislamiento (Tabla 7).

Tabla 7

Análisis de la Varianza (SC tipo III) para viabilidad

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor-P
Modelo	5332.44	9	592.49	22.66	<0.0001
Hongo	5332.44	9	592.49	22.66	<0.0001
Error	522.93	20	26.15		
Total	5855.36	29			

En la figura 49, se puede apreciar el comportamiento de los aislados de tres géneros de hongos entomopatógenos con respecto de la viabilidad, siendo esta variable la que más homogeneidad presenta, puesto que se han conformado cuatro rangos, y el grupo que presenta el valor más elevado incluye seis niveles, en donde se encuentran todos los aislados de *Beauveria* spp. que se consolidarían como el microorganismo con mayor viabilidad en el presente estudio, en tanto que la dinámica de *Paecilomyces* spp. es indistinta, pues tiene un representante en cada uno de los rangos.

El nivel con la mejor viabilidad es PMHB que alcanza 98.6% y que comparado con el más bajo que le corresponde al nivel PSB 63.63%, existe una diferencia de 34.97 puntos porcentuales. Como se había mencionado todos los aislados de *Beauveria* spp. mantienen valores que están sobre el 90%, siendo el mejor comportamiento BMHB con 98.37% y el de más bajo desempeño BSB 92.1%. En este rango también está presente el nivel PSC con 91.46%.

Existe la conformación de un rango intermedio que corresponde a *Metarhizium* sp. obtenido de la muestra colectada en suelo de bosque y *Paecilomyces* sp. aislado desde muestra de hojas de

crisantemo, sus valores son 73.83% y 75%, respectivamente. En tanto que el nivel PSB1 con forma el rango con el segundo porcentaje más bajo en viabilidad con 66.47%.

Espinoza y Vallejos (2016) reportan que *Beauveria bassiana* Bals alcanza viabilidad de conidias el 97.3%, resultado similar a los obtenidos en la presente investigación, puesto que todos los niveles de este género superaron el 90% y los aislados BMHC y BMHB alcanzaron el 98.37% y 98.27% respectivamente.

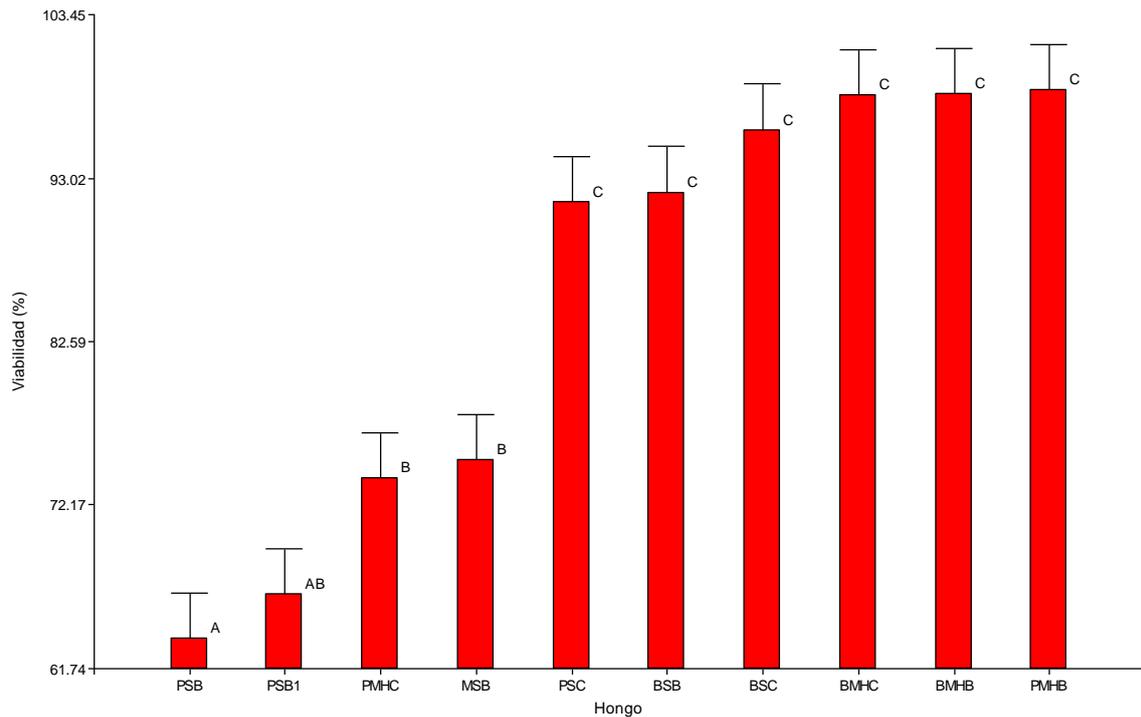


Figura 49. Viabilidad de tres géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*

En lo que respecta al género *Metarhizium*, Acuña et al. (2015) reportan que utilizando *M. anisopliae* Metschn obtuvieron un $88.7 \pm 0.6\%$ de este entomopatógeno en una valoración para formulación para biocontrol, este resultado difiere de los obtenidos en la presente investigación puesto que se determinó un 75% de viabilidad, cifra que difiere en 13 puntos porcentuales con el citado autor.

En un estudio desarrollado por Carr, Elósegui y Bel (2003) para determinar la viabilidad de *Paecilomyces fumosoroseus* Pz-5 y LBPf-4 con medio PDA inoculadas con una suspensión de 10^6 con/ml, e incubadas en cámara húmeda durante 16-18 h, se alcanzó una viabilidad del 92%, resultado que coincidiría con en el rango que obtuvo el nivel PMBH con 98,6%, en tanto que los otros niveles de *Paecilomyces* spp. fueron inferiores en este estudio.

4.6. Mortalidad *Liriomyza huidobrensis* Blanchard

En la tabla 8 se observa el análisis de varianza para la variable mortalidad, en donde se evidencia que existen interacción entre las horas de medición y el tipo de hongo (F= 7.83; gl= 90, 878; P < 0.0001), lo que determina que el comportamiento de patogenicidad de los microorganismos entomopatógenos utilizados difiere entre los géneros a prueba.

Tabla 8

Pruebas de hipótesis secuenciales para mortalidad

Fuente	Gl T	Gl E	Valor-F	Valor-P
Horas	9	878	564.79	<0.0001
Hongo	10	878	160.65	<0.0001
Horas: Hongo	90	878	7.83	<0.0001

En la figura 50, se puede observar el número de insectos muertos obtenidos por el género *Beauveria*, en donde se evidencia que el mejor desempeño para mortalidad fue para el aislado B4, el cual a 72 horas de la aplicación alcanza el valor de aproximadamente 4 insectos y a 96 horas llega a 5 minadores, lo que representa el 100% de mortalidad, en tanto que el segundo mejor desempeño es para el nivel B2 que en 72 horas llega a 3 *Liriomyza huidobrensis* B. y a las 92 horas a 4 insectos. La mortalidad más baja para este grupo le corresponde al B3 que en 72 horas consiguió un valor de 2 minadores siendo inferior en 1.67 unidades. Sin embargo, a las 168 horas las cepas B1, B2 Y B3 llegaron al 100% de mortalidad de la mosca minadora a diferencia del testigo que en ese tiempo únicamente se observó dos insectos muertos.

Malpartida, Narrea y Dale (2013) utilizaron *Beauveria bassiana* B., en una concentración de 2.1×10^6 lo cual alcanzó un porcentaje mortalidad entre el 60% y el 70% en un periodo comprendido entre 24 y 72 horas después de la aplicación, situación distinta para los resultados obtenidos en el presente estudio, pues el mejor promedio a las 24 horas de este grupo de aislados fue para el B2 con 42.2%, en tanto que a las 72 el nivel B4 resultó con un 82.2% de mortalidad.

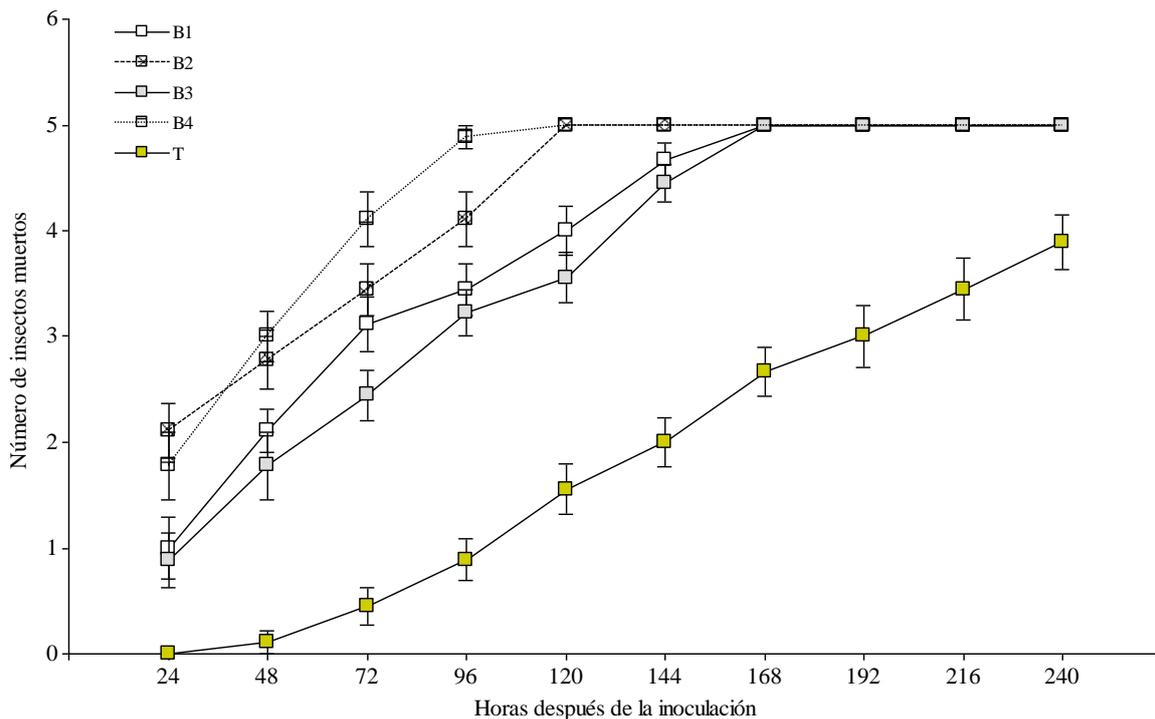


Figura 50. Mortalidad de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard con el género *Beauveria*

En la figura 51 se puede observar la mortalidad de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, con respecto de entomopatógenos del género *Paecilomyces*, el cual presenta su mejor efectividad con el P3, prácticamente en todo el estudio, además a las 24 horas ya ha alcanzado la cifra de 2 y las 72 horas ha duplicado llegando 4 insectos, a las 96 horas consiguió casi 5 insectos muertos (100%). El segundo mejor desempeño es el P1, que se diferencia del P3 en las tres primeras lecturas con un promedio de 0.85 para marcar amplia diferencia para las 96 y 120 horas cuando la brecha se extiende a 1.56 y 1.33.

En tanto que el P2 y el P5 mantienen un comportamiento similar mostrando una ligera diferencia las 96 y 120 horas cuando se evidencia una diferencia 0.34 y 0.33 respectivamente. El peor desenvolvimiento fue para el P4, el cual a las 192 horas de aplicación alcanza 4 insectos y en todas las lecturas se mantiene por debajo de todos los niveles, además completa la cifra de 5 insectos (100%) a las 240 horas. A su vez, la cepa P1 alcanzó el 100% de mortalidad a las 192 horas, mientras que el P2 Y P5 a las 216 horas.

García y González (2010) reportan que obtuvieron una mortalidad del 21% al 78% a las 72 y 96 horas después de la aplicación de *Paecilomyces fumosoroseus* Thom para el control de

Liriomyza trifolii Burgess, estos valores difieren a los resultados conseguidos en el presente estudio, puesto que el P3 alcanza el 42% a las 24 horas y las 96 horas llega 97.8%.

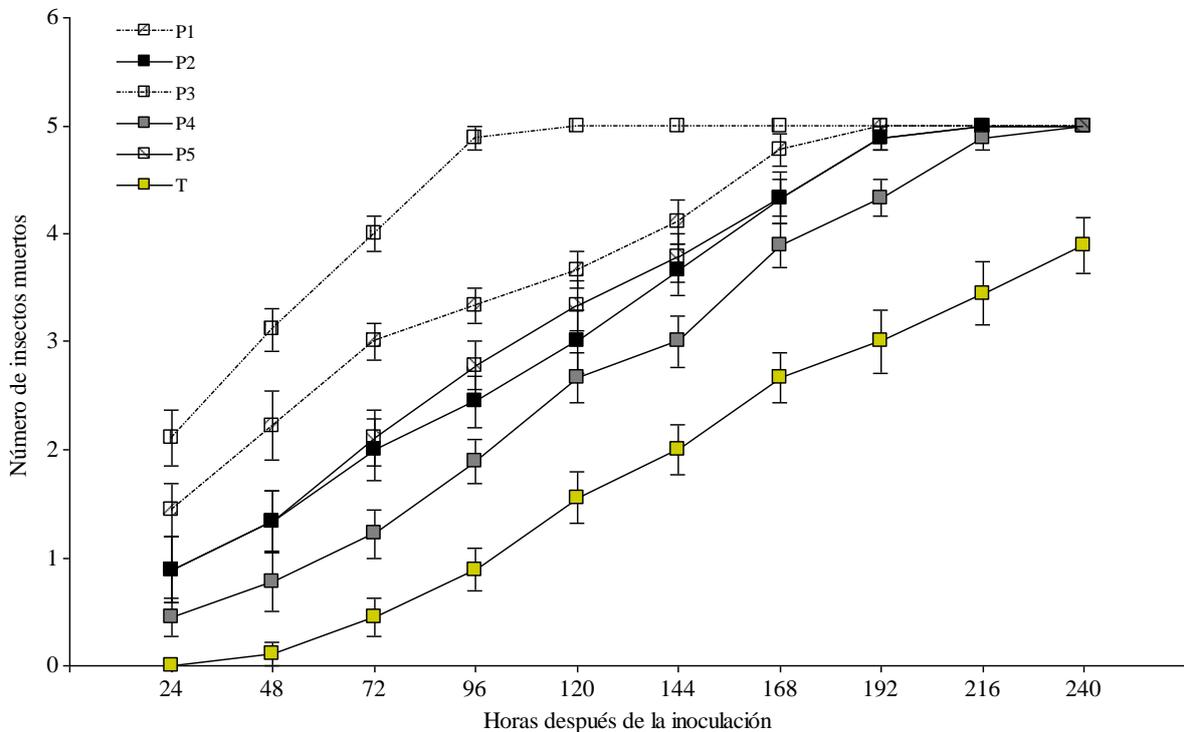


Figura 51. Mortalidad de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard con el género *Paecilomyces*

En la figura 52, se observa la efectividad del nivel de *Metarhizium* sp., el cual muestra un desempeño deficiente comprado con el P3 y el B4 que son los dos mejores en su respectivo grupo. A las 72 horas este nivel recién ha alcanzado el valor de 2 insectos, mientras que el P3 y B4 llegaron a un valor similar a las 24 horas. *Metarhizium* sp. consigue el 100% de mortalidad a las 192 horas, en tanto que P3 y B4 lo hacen aproximadamente a las 96 horas, eso quiere decir, en la mitad del tiempo.

García, Pérez, León y Pliego (2013) reportan que *Metarhizium anisopliae* Metschn en concentraciones de 3.1×10^{11} y 3.1×10^{12} conidios/ml aplicados para el control de *Bemisia tabaci* G. alcanzó porcentajes de mortalidad de hasta 70% a las 72 horas después de la aplicación, mencionados resultados se contraponen a los obtenidos en esta investigación puesto que *Metarhizium* sp. resultó con un porcentaje de 40% a las 72 horas.

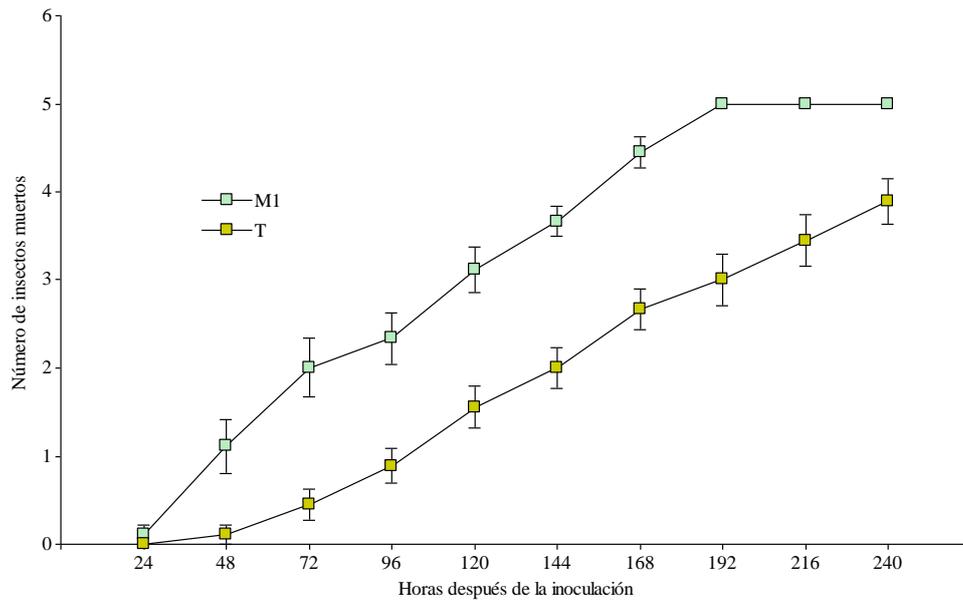


Figura 52. Mortalidad de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard al aplicar *Metarhizium* sp.

4.7. Infestación *Liriomyza huidobrensis* Blanchard

En la tabla 9 se muestra la prueba de hipótesis secuenciales para la variable de infestación, la cual determina que existe interacción entre los factores hongo y horas ($F= 5.8$; $gl= 70, 702$; $P < 0.0001$), estos resultados infieren que la infestación varía según el tiempo y el tipo de entomopatógeno.

Tabla 9

Pruebas de hipótesis secuenciales para infestación

Fuente	Gl T	Gl E	Valor-F	Valor-P
Horas	7	702	279.20	<0.0001
Hongo	10	702	611.66	<0.0001
Horas: Hongo	70	702	5.8	<0.0001

Gl T= Grados de libertad de fuente de variación

Significativo al 0.05 %

Gl E= Grados de libertad error

En la figura 53 se puede determinar que los periodos para toma de las lecturas son determinantes para la infestación, puesto que esta variable se ha homogenizado a las 144 horas después de la

contaminación, en tanto que se presentan tres rangos distintos de infestación para los tiempos 120, 96 y 72 horas. También se puede observar el comportamiento de infestación de los niveles para *Beauveria* spp., en donde el aislado B4 presenta la infección más eficiente logrando contaminar a 5 (100%) insectos a las 120 horas, se evidencia un comportamiento similar con el nivel B2 el cual infestó 4 insectos en el mismo periodo de tiempo. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Bacca y Lagos (2014) donde obtuvieron el 100% de infestación por el género de *Beauveria* en larvas de *Galleria mellonella*, sin embargo.

Dos aislados muestran los comportamientos más deficientes, esos son los niveles B1 y B3, los cuales alcanzan un nivel máximo de infestación a las 144 horas con 3 insectos respectivamente y estos valores no se alteran hasta la finalización del ensayo.

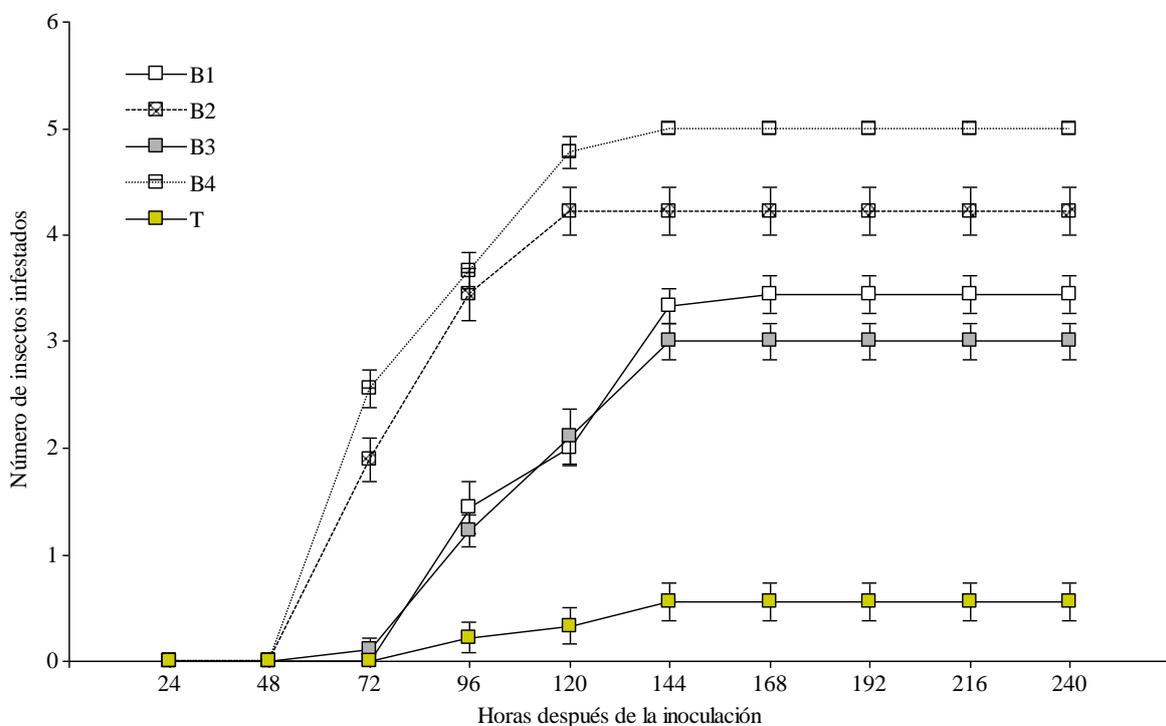


Figura 53. Infestación de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard por el género *Beauveria*

La infestación lograda con el género *Paecilomyces* (Figura 54) mantiene un comportamiento particular, puesto que el nivel tres mantiene un comportamiento excepcional, que a las 96 horas alcanza a contaminar a 3 insectos y las 120 horas sube a casi 5 minadores. Los restantes aislados se comportan de manera similar, todos ellos no completan la infestación al terminar el periodo de evaluación, es así que P5 alcanza un valor máximo de contaminación de 2 insectos, mientras que el P2 y el P4 a las 120 horas tienen el mismo valor de aproximadamente 2 que variará muy

poco hasta la finalización de la evaluación. Al respecto, Quiroga, Maya, Santos, y Hoyos (2011) evaluaron la capacidad de *Paecilomyces* spp. para infectar las cochinillas (*Crypticerya multicastrices* Cockerell) en donde obtuvieron resultados superiores al 80%, estos datos concuerdan con la infección de *Paecilomyces* asilado del macerado de hojas bosque (P3) solo *Liriomyza* spp.

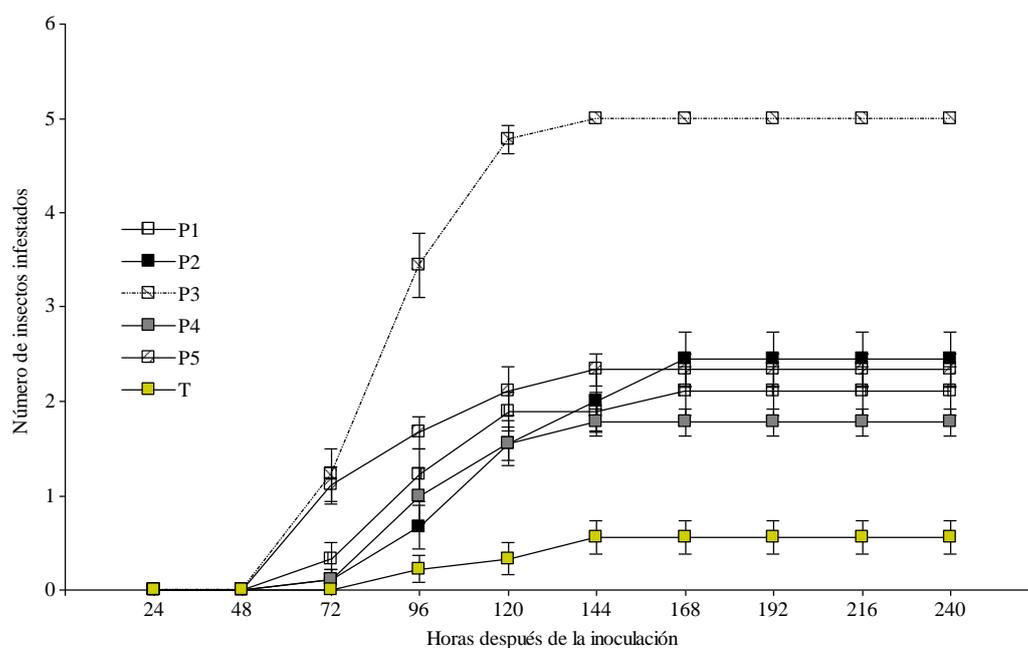


Figura 54. Infestación de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard por el género *Paecilomyces*

El de infestación a los especímenes de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard con el hongo *Metarhizium* sp. (Figura 55) se evidencia poco eficiente, puesto que presentó contaminación a las 96 horas con casi un insecto y evoluciona hasta 2 minadores a las 192 horas, siendo muy por debajo de los desempeños mostrados por *Beauveria* spp. o *Paecilomyces* spp. que sus mejores niveles las 72 horas e infectaron los 5 insectos a las 144 horas. La baja eficacia de *Metarhizium* sp. pudo ser por diversos factores como la humedad relativa, fotoperiodo, tipo de planta, tipo de insecto, temperatura, entre otros. Márquez y Gato (2017) afirman que la humedad relativa adecuada para el género *Metarhizium* es de 70% durante 14 horas para obtener una mayor infestación, al igual que para tener una mayor concentración de conidios se requiere una temperatura de 28 a 30°C, entonces se podría decir que estos factores impidieron la infestación de *Metarhizium* sp. en *Liriomyza* spp. ya que en la presente investigación se utilizó una temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de $55 \pm 5\%$.

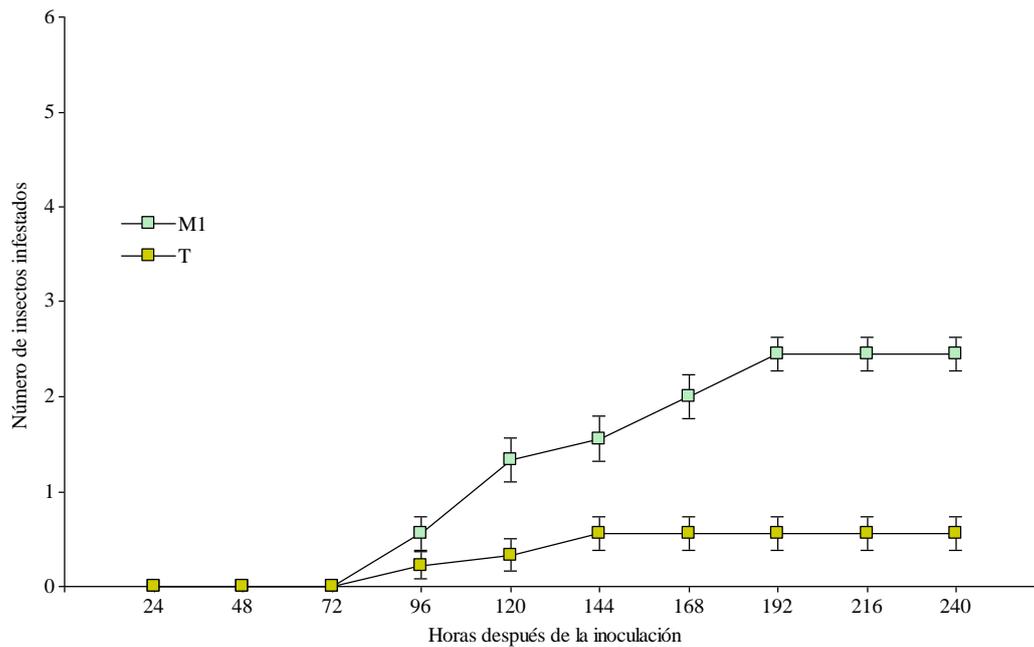


Figura 55. Infestación de *Liriomyza huidobrensis* Blanchard por el género *Metarhizium*

A su vez, León, Campos, y Arguelles (2019) observaron un 90% de infestación de *Metarhizium anisopliae* en adultos de *R. palmarum*, esta esporulación sucedió en los espiráculos, los espacios intersegmentales de la cutícula del cuerpo, las bases y terminales antenales y del rostrum. Estos datos son superiores a los obtenidos en el presente estudio, esto podría ser debido a la concentración que se utilizó y la especie del microorganismo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- En esta investigación se inició con la caracterización de la diversidad de hongos existentes en la empresa Flosisol, en donde se encontraron microorganismos antagonistas tales como: *Beauveria* spp., *Paecilomyces* spp. y *Metarhizium* sp. De la misma manera se encontró patógenos como por ejemplo *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. entre otros.
- A través de la caracterización de los hongos entomopatógenos se identificaron seis grupos en función a las siete características macroscópicas, en donde se observó varios conglomerados debido a que las cuatro cepas de *Beauveria* spp., cinco de *Paecilomyces* spp. y uno de *Metarhizium* sp. tienen rasgos únicos que lo diferencian entre ellos.
- La caracterización macroscópica de los microorganismos benéficos no sólo contribuye al establecimiento de caracteres para la especie, sino que también aporta al conocimiento de su diversidad y por ende a la conservación y uso de las cepas nativas.
- Los 10 aislamientos evaluados, presentaron un comportamiento diferencial respecto a patogenicidad contra *Liriomyza huidobrensis* B. a una concentración de 1×10^6 conidios/ml, en donde, *Paecilomyces* sp. aislado del macerado hojas bosque registró el mayor grado de mortalidad 81.6% en condiciones de laboratorio.

5.2. Recomendaciones

- Aislar microorganismos de otros sitios y otras plantas para determinar la distribución y zonas de adaptación que podrían tener los hongos entomopatógenos en la parroquia de Chavezpamba, considerando las condiciones ambientales, tipo de suelo, planta, entre otros.
- Realizar el análisis molecular de cada uno de los aislados entomopatógenos con la finalidad de identificar los hongos por especie.
- Realizar evaluaciones de patogenicidad de los aislados entomopatógenos en el campo contra *Liriomyza huidobrensis* Blanchard, debido a que los resultados serán diferentes por varios factores como temperatura, humedad relativa, clima, factores ambientales, compatibilidad con otros microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Rosas, N., López, M., Saíenz, J. C., Mundo, M. y García, C. (2015). Pathogenicity of microencapsulated insecticide from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius). *Southwestern Entomologist*, 40(3), 531-538.
- Aguilera, V., Jaén, M., Ávila, L., Herrera, J., Jaén, J., y Barba, A. (2020). Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hymenozoa: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. *IDESIA*, 38(1), 59-65.
- Almaraz, A., Alvarado, D., Tlapal, B. y Espinoza, D. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino de el Arrayanal, Colima and Tecoanapa, Guerrero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(3), 341-355.
- Anderson, N. (2007). *Flower breeding and genetics; issues, challenges and opportunities for the 21 st century. Capítulo 14 Crisantemo*. Países Bajos: Springer.
- Ardila, Y. (2013). *Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre Eurhizococcus colombianus Jakubski* (Hemiptera: Margarodidae), *plaga de mora (Rubus glaucus Benth)* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Arévalo, E., Quintero, O., y Correa, G. (2003). Reconocimiento de trips (Insecta: Thysanoptera) en floricultivos de tres corregimientos del municipio de Medellín, Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), 169-175.
- Azadia, P., Bagherib, H., Molaahmad, A., Nazarid, F., y Chandlere, S. (2016). Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances*, 34(6), 1073-1090.
- Bacca, T., y Lagos, T. (2014). Efecto de *Beauveria bassiana* y del entomonemátodo *Steinernema* sp. sobre larvas de *Galleria mellonella*. *Boletín científico centro de museos de historia natural*, 18(1), 247-258.
- Badii, M., Landeros, J. y Cerna, E. (2007). Manejo Sustentable de Plagas o Manejo Integral de Plagas. Un apoyo al desarrollo sustentable. *Culcyt*, 4(23), 13-27.

- Barg, R., y Armand, F. (2007). *Agricultura agroecológica – orgánica en el Uruguay. Principales conceptos, situación actual y desafíos*. Uruguay: Coordinadores de la edición: Maria Isabel Cárcamo y Ricardo Carrera-RAP-AL.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis, Burgess Publishing Company.
- Barranco, P. (2003). Dípteros de interés agronómico-agromicidas plaga de cultivos hortícolas intensivos. *ARACNET 11 - Bol. S.E.A*, 6(33), 293-307.
- Belkis, P., González, I., Arias, Y., Fernández, A., Miranda, I. y Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Rev. Protección Veg.*, 26(1), 16-22.
- Bustillo, A. (2009). Evaluación de insecticidas químicos y biológicos para controlar *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) en cultivos de espárragos. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 12-17.
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos* (12). Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Carr, A., Elósegui, O., y Bel, N. (2003). Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broum & Smith. *Fitosanidad*, 7(3), 27-32.
- Carrillo-Rayas, M., y Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de Insectos plaga. *Acta Universitaria*, 19(2), 40-49.
- Castillo, C., Cañizales, L., Valera, R., Godoy, J. C., Guedez, C., Olivar, R., y Morillo, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. *Academia*, 11(3), 275-281.
- Chan, W., Ruiz, E., Cristóbal, J., Pérez, A., Munguía, R., y Lara, J. (2010). Desarrollo in vitro de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Agrociencia*, 44(5), 587-597.
- Constitución de la República del Ecuador. (2008). *Registro Oficial*, 449, 20, octubre.

- Duarte, F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *Contabilidad y Negocios*, 7(14), 81-100.
- Echeverría, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (tesis de pregrado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Elósegui, O., Jiménez, J., y Carr, A. (2006). Aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitosporicos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. *Fitosanidad*, 10(4), 265-272.
- Espinoza, G., y Vallejos, F. (2016). *Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de Beauveria bassiana* (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Expoflores. (2019). *Informe Anual de Exportaciones*.
- Faria, M., y Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237–256.
- Figuroa, W., Ramírez, J., y Sigarroa, A. (2013). Efecto de las cepas nativas *Paecilomyces* sp. (Bainier) y *Lecanicillium* sp. (Zimm) en el control de *Carmenta foraseminis* Eichlin (Lepidoptera: Sesiidae) en cultivos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica (Online)*, 62(3).
- Flores, A., Silva, G., Tapia, M., y Casals, P. (2007). Susceptibilidad de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) colectada en *Primula obconica* Hance y *Convolvulus arvensis* L. a acaricidas. *Agricultura Técnica*, 67(2), 219-224.
- Forero, G., Rodríguez, M., Cantor, F., Rodríguez, D., y Cure, J. (2008). Criterios para el manejo de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) con el ácaro depredador *Amblyseius* (*Neoseiulus*) sp. (Acari: Phytoseiidae) en cultivos de rosas. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 78-86.
- García, A. (2008). *Proyecto de creación y puesta en marcha de la empresa bioinsumos de Colombia Ltda., laboratorio productor de hongos entomopatógenos y antagonistas para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos de interés agrícola* (tesis de pregrado). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.

- García, C., García, M., Vejar, G., Meza, L., y Chávez, J. (2020). Macromorfología y crecimiento radial de cepas de hongos entomopatógenos suplementado con polvo de lepidópteros. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(1), 2665-4385.
- García, C., y González, M. (2010). Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai*, 6(1), 17-22.
- García, E., Pérez, R., León, B., y Pliego, L. (2013). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(6), 1129-1138.
- García, J., Aviña, G., Orozco, A., Alvarado, O., García, M., Alejandre, G., . . . Medrano, H. (2014). Variabilidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en base a polimorfismos de ADN amplificados al azar. *PYTON*, 83, 37-43.
- García, M., Capello, S., Leshner, J., y Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28.
- Gato, Y., Márquez, M., Baró, Y., Porras, Á., Ulloa, Y., y Quesada, Y. (2016). Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Rev. de Protección Veg.*, 31(11), 50-56.
- Gaytán, A., Ochoa, D., García, R., Zavaleta, E., y Mora, G. (2006). Producción y calidad comercial de flor de crisantemo. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 541-548.
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., y Tenorio, M. (2014). *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. Perú
- Grbić, M., Van, L., Clark, R., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., . . . Van de Peer, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487-92.
- Humber, R. A. (1998). *Entomopathogenic fungal identification*. Minneapolis, Ithaca.
- Instituto de Investigaciones Agropecuarias. (2011). *Manejo de plagas en paltos y cítricos*. Chile 166 pp.

- Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México. (2014). *Manual del crisantemo*. México
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2019). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019*. Quito, Ecuador.
- Jiménez, C., Pantoja, A., y Ferney, H. (2016). Riesgos en la salud de agricultores por uso y manejo de plaguicidas, microcuenca “La Pila”. *Rev Univ. Salud.*, 18(3), 417-431.
- León, G., Campos, J., y Arguelles, J. (2019). Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 631-646.
- López, C. (2017). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* en generaciones reproductivas. *Apthapi*, 3(3).
- Malpartida, J., Narrea, M. y Dale, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del Maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81.
- Martínez, N. (2010). Manejo integrado de plagas: Una solución a la contaminación. *Comunidad y Salud*, 8(1), 73-82.
- Migiro, L., Maniania, N., Chabi, A., y Vandenberg, J. (2010). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolates to the adult pea leafminer (Diptera: Agromyzidae) and prospects of an autoinoculation device for infection in the field. *Environ Entomol.*, 39(2), 468-475.
- Minas, R. S. (2013). *Solanáceas enfoque de las principales culturas y sus plagas*. Brasil: Editora KIRON.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2008). *Registro Oficial - Acuerdo N° 390*. Quito: Lexis S.A.
- Mnyone, L., Kirby, M., Lwetoijera, D., Mpingwa, M., Knols, B., Takken, W., y Russell, T. (2009). Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*, 8(1), 309.

- Motta, P., y Betselene, M. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, 6(2), 77 - 90.
- Naranjo, A. (2017). *La otra guerra: la situación de los plaguicidas en el Ecuador*. Quito: Agencia Ecologista de Información -Tegantai.
- Narrea, M., y Malpartida, J. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. *Rev. perú. Entomol.*, 45, 145 -147.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.
- Noujeim, E., Sakr, J., El Sayegh, D., y Nemer, N. (2015). In vitro susceptibility of the pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* pupae to entomopathogenic *Heterorhabditis indica* and *Beauveria bassiana*. *Lebanese Science Journal*, 16(2), 19-26.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. Lima: Alain Santandreu IPES/RUAF.
- Osorio, A., y Canal, N. (2011). Selección de Cepas de Hongos Entomopatógenos para el Manejo de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae) en Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 64(2), 6129-6139
- Padilla, G., Bernal, M., Vélez, P., y Montoya, E. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé*, 51(1), 28-40.
- Pandia, H. A., y Saxena, O. P. (2001). Preservation of *Chrysanthemum* sp. *Horticulturae*, 543, 367-370.
- Paredes, D., Campos, M., y Cayuela, L. (2013). El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estado del arte. *Ecosistemas*, 22(1), 56-61.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., y De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.

- Puerto, A., Suárez, S., y Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 52(3), 359-82.
- Quiroga, I., Maya, M., Santos, A., y Hoyos, L. (2011). *Paecilomyces* sp. como alternativa de control de la cochinilla acanalada (*Crypticerya multicastrices* Cockerell) en San Andrés, Colombia. *Boletín del museo entomológico*, 3(4), 1-9
- Raymundo, R., García, E., López, I., y Yakovleva, N. (2019). Producción y germinación de conidios del hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae). *Scientia Fungorum*, 49.
- Reitz, S. (2009). Biology and ecology of the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae): The making of a pest. *Florida Entomologist*, 92(1), 7-13.
- Rhains, M., Doyon, J., Rivoal, J., y Brodeur, J. (2007). Thrips induced damage of chrysanthemum inflorescences: evidence for enhanced leakage of carotenoid pigments. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123(3), 247-252.
- Rimache, M. (2011). *Floricultura cultivo y comercialización*. Surquillo, Bogotá: Ediciones de la U.
- Rimache, M. (2013). *Floricultura manejo y comercialización*. Surquillo, Perú: Macro E.I.R.L.
- Ríos, R., Vargas, J., Sánchez, J., Oliva, R., Alarcón, T., y Villegas, P. (2020). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 419-426.
- Rodríguez, M., Gerding, M., y France, A. (2006). Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: gelechiidae). *Agricultura Técnica*, 66(2), 151-158.
- Ruiz, E., Chan, W., Pérez, A., Cristóbal, J., Uch, B., Tun, J., y Munguía, R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación in vitro de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaci*. *Rev. Mex. Mic*, 33, 9-15.
- Salvo, A., y Valladares, G. (2007). Parasitoides de minadores de hojas y manejo de plagas. *Ciencia de Investigación Agraria*, 34(3), 167-185.

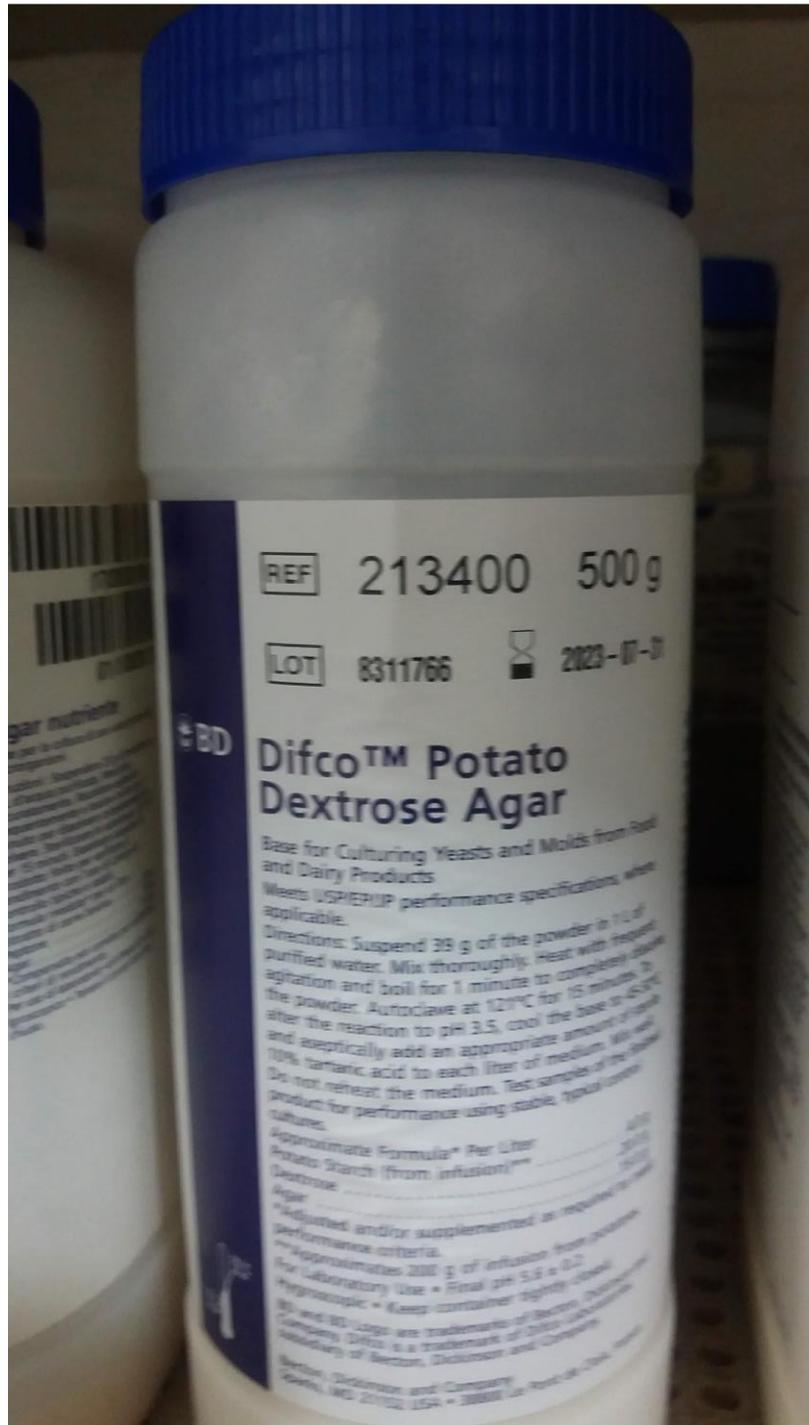
- Tehri, K. (2014). A review on reproductive strategies in two spotted spider mite, *Tetranychus Urticae* Koch 1836 (Acari: *Tetranychidae*). *India Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(5), 48-52.
- Tejeda, O., Ríos, Y., Trejo, L., y Vaquera, H. (2015). Caracterización de la producción y comercialización de flor de corte en Texcoco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 1105-1118.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., y Tirry, L. (Ed.). (2009). *Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. Bélgica: Springer, Países Bajos.
- Van Uffelen, R. L., y de Groot, N. S. (2005). Floriculture World Wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges (No. 1074-2016-87038)
- Valdez, L., Hernández, A., Alvarado, D. y Cruz, Á. (2015). Diseño de un programa de fertilización para crisantemo en base a extracción de macronutrientes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(12), 2263-2276
- Vargas, R., Olivares, N. y Ubillo, A. (2008). *Manejo integrado de resistencia (MIR) y selectividad de plaguicidas*. Chile: INIA CHILE.
- Vázquez, G. (2016). *Problemas fitosanitarios del crisantemo (Dendranthema grandiflora Tzevelev), var. polaris en el municipio de Villa Guerrero, estado de México* (tesis pregrado). Universidad Autónoma del Estado de México, Mexico.
- Vázquez, L., Caballero, S., Carr, A., Gil, J., Armas, J., Rodríguez, A., . . . Ramos, T. (2010). Diagnóstico de la utilización de entomófagos y entomopatógenos para el control biológico de insectos por los agricultores en Cuba. *Fitosanidad*, 14(3), 159-169.
- Vela, P., Pineda, J., Duarte, A., Soto, C., y Pineda, C. (2018). Cepa nativa ecuatoriana de *Beauveria bassiana* con potencial industrial. *Revista Biorrefinería*, 1(1), 23-31.
- Villegas, F., Díaz, O., Casas, S., Monreal, T., Tamayo, F., y Aguilar, S. (2017). Actividad de dos hongos entomopatógenos, identificados molecularmente, sobre *Bactericera cockerelli*. *Revista Colombiana de Entomología*, 43(1), 27-33.

- Vivas-Carmona, L. E. (2017). El Manejo Integrado de Plagas (MIP): Perspectivas e importancia de su impacto en nuestra región. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2), 67-69.
- Weintraub, P., Scheffer, S., Visser, D., Valladares, G., Soares, A., Shepard, M., . . . Blanco, H. (2017). The invasive *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae): Understanding its pest status and management globally. *Journal of Insect Science*, 17(1), 1-27.
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 53-67

ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos, el proceso de caracterización y la patogenicidad de los mismos se utilizó el de medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA), a la dosis de 39g/l de agua destilada estéril (ADE).



Anexo 2. Registro de temperatura y humedad relativa de los aislados entomopatógenos

FECHA		07:30		12:00		03:30				
		Temp	Humedad	Temp	Humedad	Tem	Humedad			
L 08-06-20		27.4	27	46	28.8	30	62	27.4	30	60
M 09-06-20	Smr	27.3	28	60	28.6	29	62	27.9	26	64
M 10-06-20	24	28.9	29	55	28.3	29	65	28.7	29	62
T 11-06-20		28.4	28	63	29.3	30	60	29.4	29	58
V 12-06-20		27.1	28	60	28.8	30	64	27.5	30	65
L 15-06-20		27.0	28	48	29.0	30	62	28.9	29	60
M 16-06-20	Smr	27.6	28	60	28.2	30	62	28.0	30	57
M 17-06-20	25	27.7	28	63	28.7	30	62	27.7	29	60
J 18-06-20		28.3	26	66	28.6	30	62	28.2	29	65
4 19-06-20		27.2	28	62	27.7	28	64	27.1	28	64
L 22-06-20		27.7	29	47	27.4	29	59	27.9	28	62
M 23-06-20		28.8	29	60	28.2	29	60	27.9	29	60
M 24-06-20	Smr	27.4	29	58	28.9	30	61	27.2	29	61
J 25-06-20	26	27.4	28	60	27.5	28	60	27.5	28	61
V 26-06-20		27.9	28	62	27.5	28	63	27.5	29	60
L 29-06-20		28.5	29	48	28.0	29	62	28.4	28	62
M 30-06-20		28.9	28	61	28.1	29	59	28.1	28	60
M 01-07-20	Smr	27.3	28	59	27.8	28	63	27.4	28	62
J 02-07-20	27	27.4	28	60	27.4	28	62	27.1	27	64
V 03-07-20		28.8	28	61	28.7	28	62	27.2	28	67
L 06-07-20		28.0	28	60	28.7	29	62	26.2	29	30
M 07-07-20	Smr	28.6	28	56	28.5	28	62	28.3	29	62
M 08-07-20	28	27.9	25	61	27.4	28	62	27.1	28	62
J 09-07-20		28.5	28	62	27.2	29	64	28.2	29	59
V 10-07-20		27.4	28	62	27.4	28	62	27.2	28	67
L 13-07-20		28.4	29	46	27.9	29	61	28.3	29	63
M 14-07-20	Smr	27.5	28	60	28.3	29	62	28.2	29	63
M 15-07-20	29	28.9	28	60	28.8	30	62	29.0	30	64
J 16-07-20		27.1	28	60	27.4	30	62	27.2	30	64
V 17-07-20		28.9	29	47	28.7	29	64	28.9	30	62

Anexo 3. Fungicida y antibiótico

Para el aislamiento de los microorganismos benéficos se utilizó el fungicida Syllit (a) compatible con los hongos entomopatógenos a una dosis de 0.08 g/l y el antibiótico (b) a 1000 μ l/500ml de PDA con la finalidad de evitar la presencia de bacterias y hongos patogénicos y ambientales.

a



b

