

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

Evaluación de aislados fúngicos como posibles entomopatógenos frente al trips *Frankliniella occidentalis*

Mención: Hortofruticultura y Jardinería.

Modalidad: Técnico-Experimental.

Curso 2019/2020

Alumno/a: María Lucía Hernández Méndez

Director/es:

Dr. D. Fernando José Diánez Martínez
Dra. Dña. Milagrosa Santos Hernández

0. ÍNDICE

1. MEMORIA DESCRIPTIVA.....	2
1.1. Interés y objetivos	2
1.1.1. Interés	2
1.1.2. Objetivos	3
1.2. Revisión bibliográfica	3
1.2.1. Introducción	3
1.2.2. Plaguicidas y su futuro	3
1.2.3. Control biológico y microbiológico.....	4
1.2.4. Control de insectos fitófagos	5
1.2.5. Principales plagas en cultivos de invernadero	15
1.2.6. Características generales del orden tisanópteros.....	17
1.2.7. <i>Frankliniella occidentalis</i>	21
1.2.8. Hongos entomopatógenos más usados contra los tisanópteros.....	23
2. FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA ASOCIADO	32
3. ESPECIFICACIONES Y REQUERIMIENTOS TÉCNICOS.....	37
3.1. Materiales	37
3.1.1. Material de laboratorio	37
3.1.2. Medio de cultivo.....	38
3.1.3. Hongos entomopatógenos empleados	38
3.1.4. Material vegetal	40
3.1.5. Material inocuo	40
3.1.6. Otros.....	41
3.2. Métodos	44
3.2.0. Esquema resumen de los recipientes/maceteros en el invernadero.	44
3.2.1. Preparación del medio de cultivo en placas Petri.....	45
3.2.2. Selección y aislamiento de los 7 hongos no descritos. (PAE, Cont, 11H, Cl, H1, TA, TS).....	45
3.2.3. Preparación de las semillas y esterilización del sustrato.	46
3.2.4. Dilución de esporas, preparación de los recipientes donde se colocarán las semillas y acoplamiento del invernadero.	47
3.2.5. Inoculación de los 7 hongos entomopatógenos en el sustrato.	49

3.2.6. Eliminación de las plántulas muertas o inviables y riego de todos los recipientes por inundación en las bandejas.	50
3.2.7. Pulverización a los cotiledones (foliar) de los distintos aislados fúngicos con una dosis de 100000 esporas por planta.	50
3.2.8. Recogida en campo de <i>Frankliniella occidentalis</i>	51
3.2.9. Realización de dos determinaciones distintas.	51
3.2.10. Realización del corte de las plantas cuando el número de grados día acumulados fue próximo a 264.	52
3.2.11. Procesamiento de datos y realización del informe con los resultados obtenidos..	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. ENSAYO I: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación en suelo/sustrato 144 plantas.	55
4.2. ENSAYO II: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación foliar 144 plantas	58
4.3. ENSAYO III: 8 tratamientos x 9 plantas de aplicación foliar 72 plantas y 144 cotiledones.	60
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS	64
5.1. Conclusión	64
5.2. Recomendaciones	64
6. BIBLIOGRAFÍA	66

A. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	8
Tabla 2. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos	13
Tabla 3. Duración de cada etapa del ciclo de vida de los trips. *Esta es una guía general que se aplica a la mayoría de las especies de trips	18

B. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo biológico del hongo.....	8
Figura 2a. Conidias sobre la cutícula de un insecto	11
Figura 2b. Formación de apresorio.....	11
Figura 3. Mosca blanca en distintos estadios.....	15
Figura 4a y 4b. Planta de pimiento parasitada por pulgón	16
Figura 5. Macho y hembras adultas de <i>Tetranychus urticae</i> (Archivo Unidad docente de Entomología, Universidad Politécnica de Valencia)	16
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Frankliniella occidentalis</i>	17
Figura 7. Trips adultos y daño en hoja.....	19
Figura 8. <i>Frankliniella occidentalis</i> dulto	21
Figura 9. Afidio infectado por <i>Beauveria bassiana</i>	23
Figura 10. <i>Beauveria bassiana</i> en placa Petri	24
Figura 11. Insecto colonizado por <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	25
Figura 12. <i>Verticillium lecanii</i> atacando ninfas de la cochinilla de la tizne	26
Figura 13. Crecimiento de <i>Verticillium lecanii</i>	28
Figura 14. Insecto colonizado por <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
Figura 15. Material de laboratorio	37
Figura 16a. PDA (Agar papa dextrosa) en bote	38
Figura 16b. Placa petri con medio de cultivo	38

Figura 17. Hongos empleados	39
Figura 18. Semillas de pepino variedad Wisconsin	40
Figura 19. Semillas de pepino Wisconsin en bandeja dispuestas para pregerminación en un medio húmedo	40
Figura 20. Sustrato esterilizado: mezcla de turba con vermiculita al 70-30 respectivamente.....	40
Figura 21. Sustrato humedecido con agua.....	41
Figura 22. Autoclave	41
Figura 23. Maceteros/ recipientes rojos	42
Figura 24. Recipientes naranjas y bandeja	42
Figura 25. Invernadero	42
Figura 26. Microscopio	43
Figura 27. Esquema resumen del montaje del ensayo en el invernadero	43
Figura 28a y 28b. Sembrado de hongos en placa Petri con PDA.....	45
Figura 29. Autoclave con bolsa de sustrato preparada para esterilizar	46
Figura 30a. Extracción de las esporas.....	47
Figura 30b. Dilución de las esporas	47
Figura 31. Preparación del sustrato en recipientes.....	48
Figura 32. Incorporación por riego de los aislados fúngicos al sustrato	49
Figura 33. Pulverización foliar de los hongos en los cotiledones.....	50
Figura 34. <i>F. occidentalis</i> adultos y daño por trip en cotiledones.....	49
Figura 35a. Corte de cotiledones y puesta en recipientes de tapadera naranja ..	51
Figura 35b. Larva de <i>F. occidentalis</i> sobre cotiledón	51

C. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Número medio de adultos/planta en tratamientos al sustrato	54
Gráfico 2. Número medio de larvas/planta en tratamientos al sustrato.....	55

Gráfico 3. Número medio de adultos sciaridos/planta en tratamiento al sustrato..	56
Gráfico 4. Número medio de adultos/planta en tratamientos foliares	57
Gráfico 5. Número medio de larvas/planta en tratamientos foliares.....	58
Gráfico 6. Número medio de adultos sciaridos/planta en tratamientos foliares	59

MEMORIA DESCRIPTIVA

1. MEMORIA DESCRIPTIVA

1.1. Interés y objetivos

1.1.1. Interés

Los trips son insectos de muy pequeño tamaño de cuerpo alargado y cilíndrico que pertenecen al orden Thysanoptera. Estos insectos son una de las principales plagas en cultivos bajo invernadero ya que poseen una gran resistencia y capacidad de adaptación, además de producir daños directos en nuestra plantación.

Otro aspecto importante es que son transmisores de virus muy polífagos, en especial el virus del bronceado del tomate (TSWV), que es el causante de importantes daños económicos a nivel hortícola.

Así pues, es de vital importancia encontrar nuevas herramientas de control microbiológicas complementarias o sustitutivas al control con enemigos naturales.

Existen varios depredadores biológicos de *Frankliniella occidentalis*, como pueden ser *Orius laevigatus*, *Amblyseius swirskii*, *Stratiolaelaps scimitus* o *Neosiulus cucumeris*. Todos ellos son ácaros y chinches capaces de alimentarse de presas como el trip.

Pero además existen otras vías que no podemos observar a simple vista y en las cuales tendremos que hacer un ejercicio de observación más detallada como se trata el caso de los microorganismos antagonistas, en nuestro caso hongos entomopatógenos, que pueden ser una vía de escape para cultivos donde la instalación de depredadores más grandes no pueda llevarse a cabo.

Podemos encontrar numerosas referencias sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos, que por su capacidad de producir enfermedad y muerte en insectos, son utilizados como agentes de control biológico (Asaff et al., 2002).

De los diferentes microorganismos empleados, los hongos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Téllez–Jurado et al., 2009).

Los insectos, por su parte, tienen mecanismos de defensa contra las agresiones de los entomopatógenos, que involucran barreras físicas, defensas humorales, defensas celulares y de comportamiento social (Téllez–Jurado et al., 2009).

La utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura ha ido en aumento en los últimos años debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas, representando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados

altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas (Téllez–Jurado et al., 2009).

El entendimiento de los mecanismos involucrados durante el proceso de infección y la utilización de las nuevas técnicas de ingeniería genética permitirán la obtención de nuevos productos biológicos efectivos para su utilización en campo y la protección de especies benéficas de insectos (Téllez–Jurado et al., 2009).

1.1.2. Objetivos

El objetivo general que se plantea en este ensayo es evaluar la capacidad de control sobre el trips *Frankliniella occidentalis* de 7 hongos entomopatógenos no caracterizados previamente. Objetivos específicos:

- Evaluar la aplicación foliar y su efecto en el desarrollo larvario de la plaga.
- Evaluar la aplicación al sustrato y su efecto en el desarrollo de las fases de prepupa, pupa y emergencia de nuevos adultos.

1.2. Revisión bibliográfica

1.2.1. Introducción

La protección y el control de enfermedades en cultivos se han venido desarrollando convencionalmente a través de métodos químicos obtenidos por síntesis orgánica. Sin embargo, los riesgos derivados del uso indiscriminado y sin limitaciones de los plaguicidas de síntesis ha provocado la disminución de la diversidad funcional de los ecosistemas (Rubio y Fereres, 2005).

La diversidad funcional es la ocurrencia y distribución de funciones metabólicas y fisiológicas entre los miembros de una comunidad, la cual es necesaria para desarrollar funciones tales como descomposición de materia orgánica o ciclo de nutrientes.

Debido al exceso de plaguicidas, la explotación de nuestros suelos, la degradación del entorno de nuestros cultivos; los hemos forzado a que no funcionen a pleno rendimiento y que se encuentren en desequilibrio.

En todos los sistemas en los que el ser humano no interviene, no hay una gran incidencia de plagas y enfermedades, no porque no existan, sino porque se encuentran en equilibrio, por lo que el daño ocasionado por esta es muy bajo.

1.2.2. Plaguicidas y su futuro

Un problema con el que se encuentra la agricultura en la Europa Comunitaria es la supresión programada de plaguicidas que, por diversas razones, dejarán de estar en

el mercado en un plazo breve. Además de la preocupación con respecto a la desaparición de la capa de ozono plantea el problema de la búsqueda de métodos alternativos para combatir patógenos (Rubio y Fereres, 2005).

El presente y futuro está en la Producción Integrada y en la Producción Ecológica.

La Producción Integrada no implica ninguna metodología nueva, sino que desarrolla y emplea de forma racional los mecanismos de conservación de suelo, lucha biológica, optimización de tecnologías de riego, fertilización, limitando las intervenciones químicas a las estrictamente necesarias y minimizando los efectos secundarios indeseables de los plaguicidas.

El futuro más esperanzador viene de la mano de la Producción Ecológica, que es un sistema de gestión y producción agroalimentaria que combina las mejores prácticas ambientales junto con un alto nivel de biodiversidad y de preservación de los recursos naturales, así como la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal, con el fin de obtener una producción de acuerdo a las preferencias de determinados consumidores por los productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, s.f.).

Así pues, el ser humano necesita nuevos agentes de control para conseguir un rendimiento y una calidad mejorados de acuerdo con la demanda.

1.2.3. Control biológico y microbiológico

La mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales que se pueden usar como mecanismo de lucha en un programa de control biológico (Rubio y Fereres, 2005).

El llamado control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales de una plaga para disminuir su población. Esto se puede realizar introduciendo en una determinada zona o región los enemigos naturales propios del lugar de origen de la plaga (Rubio y Fereres, 2005).

También se pueden potenciar los propios enemigos naturales nativos presentes en el lugar de origen donde la plaga se encuentra ya establecida. En un sentido restringido control biológico (o control microbiológico) es la introducción artificial de microorganismos antagonistas en un ecosistema determinado para controlar a un patógeno o una plaga (Rubio y Fereres, 2005).

Este concepto deriva del usado por los entomólogos de introducir depredadores para controlar las plagas de insectos. Quizá la definición más amplia y acertada de control biológico es la propuesta por uno de los pioneros en el tema, Paul Debach, que lo definió como “la acción de parásitos, depredadores y patógenos destinada a

mantener la densidad poblacional de otro organismo a un nivel inferior al que se mantendría en su ausencia” (DeBach, 1964).

El control biológico de insectos fitófagos se remonta al año 324 AC en el que los chinos empleaban la hormiga Faraón, *Monomorium pharaonis* para el control de plagas de grano almacenado (Rubio y Fereres, 2005).

La lucha biológica tiene un potencial muy grande, pero es necesario una investigación más profunda sobre este tema para lograr un control efectivo (Rubio y Fereres, 2005).

No hay que olvidar que el control biológico tiene unas propiedades y requerimientos muy diferentes a los métodos de control tradicionales, y ha de ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción existentes actualmente (Rubio y Fereres, 2005).

El control biológico depende de un funcionamiento efectivo del antagonista apropiado para cada ecosistema particular planta-patógeno. La identificación de aislados antagonistas apropiados es siempre el primer paso en este proceso. La pauta a seguir para cada cultivo y cada área dependerá de un estudio a fondo de cada situación particular (Rubio y Fereres, 2005).

Actualmente, 100 especies de hongos entomopatógenos tienen un efecto insecticida y 20 se utilizan para el control microbiológico a nivel mundial.

En el caso del control biológico de plagas en Europa se ha producido un gran aumento en los últimos años en cuanto a la cantidad de agentes de biocontrol disponibles (parasitoides, depredadores y entomopatógenos). Dichos agentes son empleados especialmente para el control de plagas en cultivos bajo invernadero con resultados muy satisfactorios (Van Lenteren, 2003).

1.2.4. Control de insectos fitófagos

El Control Microbiano de insectos fitófagos es el uso de microorganismos entomopatógenos para los insectos, principalmente hongos y bacterias siendo una estrategia muy deseable dentro de los programas de Control Integrado de Plagas, ya que son capaces de reducir las poblaciones de plagas a niveles inferiores a las que causan un daño económico, con la consiguiente disminución del uso de insecticidas de síntesis y sus consecuencias negativas para el medio ambiente (Rubio y Fereres, 2005).

1.2.4.1. Control de insectos por hongos

El potencial que tienen los hongos entomopatógenos como agentes de control, al constituir un grupo con más de 750 especies de casi 100 géneros que pueden infectar insectos, ha sido ampliamente reconocido. La mayoría de estos hongos pertenecen a las divisiones Zygomycota (entomoptorales), Deuteromicota (hifomicetos) y Ascomycota y se encuentran comúnmente en la naturaleza. Sin embargo, solo algunos hongos entomopatógenos han sido estudiados a fondo y son utilizados comercialmente (Pucheta Díaz et al., 2006).

Entre los insecticidas microbianos, los hongos entomopatógenos son los más eficaces para el biocontrol de insectos picadores-chupadores, tales como los pulgones y mosca blanca (Orden: Homoptera) ya que el modo de infección es por contacto con la cutícula del insecto (Rubio y Fereres, 2005).

Entre los hongos que afectan principalmente a los pulgones destacan el orden Entomophthorales y algunos hongos mitospóricos, entre los que destacan *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*, considerados los patógenos más efectivos en condiciones de campo e invernadero. Estos dos últimos hongos se están produciendo comercialmente y se usan como agentes de biocontrol (Rubio y Fereres, 2005).

Los hongos entomofthorales son un orden de Zigomicetos que comprende numerosos géneros y muchas especies de estos hongos parasitan insectos (Rubio y Fereres, 2005).

La mayoría de estos hongos presentan una alta especificidad de hospedador y son parásitos obligados y aunque desde este punto de vista son buenos aspirantes para controlar insectos, presentan el problema de que son complicados de cultivar a escala industrial por sus requerimientos nutritivos, que son bastante complejos. Los géneros más importantes encontrados en campo atacando insectos son *Conidiobolus*, *Erynia* y *Entomophthora* (atacan pulgones), *Zoophthora* (pulgones, orugas y escarabajos) y *Entomophaga* (saltamontes y orugas) (Rubio y Fereres, 2005).

El ciclo de infección del insecto se inicia con una espora del hongo o un conidio que aterriza en la cutícula del insecto, en condiciones favorables la espora germina, produciendo un tubo germinal que penetra la cutícula, una vez en la hemolinfa el hongo coloniza al insecto (Rubio y Fereres, 2005).

Una colonización completa del insecto típicamente requiere de 7 a 10 días y el insecto muere. Algunos hongos producen toxinas peptídicas durante la colonización y en estos casos el insecto muere antes (Rubio y Fereres, 2005).

En el insecto muerto, el micelio sale al exterior y forma nuevas esporas o conidios que infectan a nuevos insectos, completándose el ciclo. Hace más de un siglo que se ha intentado usar los hongos para controlar insectos, el primer intento se realizó en Rusia

para controlar el abejorro *Anisoplia austriaca* con el hongo *Metarhizium anisopliae* (Rubio y Fereres, 2005).

Los géneros *Paecilomyces*, *Aschersonia* y *Verticillum* han sido encontrados causando infecciones naturales sobre *Bemisia tabaci*. Se ha observado que los estadios ninfales de esta especie son muy susceptibles a las infecciones por *V. lecanii*; mientras que el control es bajo sobre el estado de huevo y no genera mortalidad en el estado adulto. Por otro lado, en condiciones de laboratorio se ha encontrado que numerosas cepas aisladas de distintos huéspedes y regiones geográficas de los hongos *Paecilomyces spp.* Y *Beauveria bassiana* son altamente virulentas para *Bemisia argentifolii* (Rubio y Fereres, 2005).

En ensayos realizados en invernaderos comerciales de tomate y pimiento en Almería y Alicante se observó un aumento significativo de la mortalidad de *B. tabaci* y *T. vaporariorum* en las parcelas tratadas con una formulación de *V. lecanii* con respecto a las no tratadas. Además, se observó que la mortalidad causada por los insecticidas químicos no fue diferente de la producida en las parcelas no tratadas, lo que muestra el alto nivel de resistencia adquirida por la plaga a los insecticidas convencionales en el área de estudio, concluyendo que la utilización de *V. lecanii* es una excelente alternativa en el control de moscas blancas y una herramienta eficaz en los programas de manejo de resistencias (Rubio y Fereres, 2005).

Cuando se pretende utilizar a estos hongos entomopatógenos como bioinsecticidas, es necesario realizar una caracterización exhaustiva de aislados con el fin de seleccionar aquellas que presenten alta virulencia y buenas condiciones para su aplicación en campo (Rubio y Fereres, 2005).

En esta caracterización se incluyen estudios referidos al modo de infección y también hoy en día es importante realizar estudios sobre los determinantes moleculares y bioquímicos relacionados con la especificidad del hongo al huésped y el papel de la filogenia y la ecología en la expresión del rango de huéspedes por hongos patógenos (Rubio y Fereres, 2005).

1.2.4.2. Relación patógeno-hospedero

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia dentro de los agroecosistemas por su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero. En este último caso, el insecto hospedero es capaz de ejercer una presión de selección que favorezca a pocos genotipos del patógeno; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero (Pucheta Díaz et al., 2006).

La Figura 1 muestra esquemáticamente el ciclo de vida del hongo (Pucheta Díaz et al., 2006).



Figura 1. Esquema del ciclo biológico del hongo. Fuente (Informaciones agronómicas, s.f.)

Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos:

a) Invasión y adhesión de la espора a la cutícula del hospedero y germinación de la espора:

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espора del primero es depositada en la superficie de este último (Téllez–Jurado et al., 2009).

El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espора a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espора pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Téllez–Jurado et al., 2009).

El proceso de adhesión de la espora a la cutícula del insecto está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas (Téllez-Jurado et al., 2009).

Los iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas promoviendo la adhesión de las esporas (Pucheta Díaz et al., 2006).

b) Germinación de la espora y penetración en el hemocele:

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Téllez-Jurado et al., 2009).

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el físico consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Téllez-Jurado et al., 2009).

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001).

c) Multiplicación y replicación del hongo en el hemocele:

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia (Téllez-Jurado et al., 2009).

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Téllez-Jurado et al., 2009).

Tabla 1. Resumen del mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.

Para que la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia (Pucheta Díaz et al., 2006).

Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los funguicidas (Pucheta Díaz et al., 2006).

La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrimentos presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos (Pucheta Díaz et al., 2006).

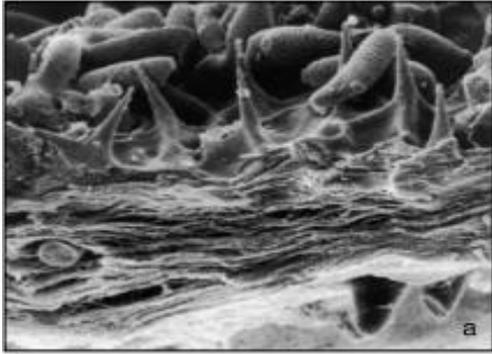
Las esporas de los entomopatógenos tienen requerimientos específicos de agua y temperatura, así como de otros factores ambientales que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno y que les permiten llevar a cabo el proceso infectivo sobre el hospedero (Hajek, 1997).

Los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos (Pucheta Díaz et al., 2006).

1.2.4.3. Mecanismo patogénico

Los hongos entomopatógenos inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio adecuado para establecer la asociación patógeno-hospedero y formar los túbulos germinales y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo (Pucheta Díaz et al., 2006).

Se ha demostrado que iones divalentes como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión pared celular fúngica-cutícula (Figura 2a), creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero (Barnes y Moore, 1997; Jeffs et al., 1997; Kershaw y Talbot, 1998; Wessels, 1999).



·Figura 2a. Conidias sobre la cutícula de un insecto. Fuente (Pucheta Díaz et al., 2006).



·Figura 2b. Formación de apresorio. Fuente (Pucheta Díaz et al., 2006).

La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996).

La hidratación de la espora es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por sistema inmune del insecto (Pucheta Díaz et al., 2006).

Metarhizium anisopliae presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto. Sin embargo, se han encontrado esterases y proteasas en conidias no germinadas, lo que sugiere una modificación de la superficie cuticular previa a la germinación, ya que durante la hidratación la espora no solo absorbe agua, sino también nutrientes (Pucheta Díaz et al., 2006).

Los lípidos que se encuentran en la cutícula de la mosca blanca pueden afectar potencialmente la germinación de la espora como resultado de su acción fungilítica o fungiestática, o actuando como una barrera en la matriz de quitina del exoesqueleto del insecto, previniendo que la espora entre en contacto con los nutrimentos y se inicie la señal de disparo de la germinación (James et al., 2003).

Después del hinchamiento de la espora tiene lugar la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular. Los iones H^+ y Ca^{2+} entran en la punta

de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía (Pucheta Díaz et al., 2006).

Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio (Figura 2b), una estructura especializada formada en el tubo germinativo (Pucheta Díaz et al., 2006).

El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Wessels, 1999).

El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (Monzón, 2001).

Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula conformada principalmente de fibrillas lameladas de quitina embebidas en una matriz proteínica que actúa como cubierta física protectora ante las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999).

Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear (Pucheta Díaz et al., 2006).

Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es adecuada (Gillespie y Claydon, 1989).

Cabe destacar que, durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrientes pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Pucheta Díaz et al., 2006).

Sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas (Pucheta Díaz et al., 2006).

1.2.4.4. Toxinas de hongos entomopatógenos

Las referencias bibliográficas citan un número considerable de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos, muchos de los cuales han demostrado poseer una actividad insecticida marginal (Gillespie y Claydon, 1989).

En la Tabla 2 podemos encontrar los principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos con una clasificación más detallada.

Clasificación	Hongos que las producen
No peptídicas	
Oospereína	<i>Beauveria tenella</i> , <i>B. bassiana</i>
Tenellina	<i>B. tenella</i>
Bassianina	<i>B. bassiana</i>
Ácido oxálico	<i>Beauveria</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Metarhizium</i>
Ácido fusárico	<i>Fusarium</i>
Ácido dipicolínico	<i>Beauveria</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Verticillium</i>
Paecilomicinas	<i>Paecilomyces tenuipes</i>
Peptídicas lineales	
Leucinostinas	<i>Paecilomyces</i>
Efraeptinas	<i>Tolytocladium</i>
Peptídicas cíclicas	
Beuvericina	<i>B. bassiana</i> , <i>Paecilomyces</i>
Beauverólidos	<i>B. bassiana</i> , <i>Paecilomyces</i>
Destruxinas	<i>Metarhizium</i>
Eniatinas	<i>Fusarium</i>
Ciclosporinas	<i>Metarhizium</i>

Modificada de Khachatourians, 1996.

Tabla 2. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos. Fuente (Téllez–Jurado et al., 2009).

Varias especies de hongos entomopatógenos son capaces de producir ácidos orgánicos y algunos de ellos han sido implicados en el proceso infectivo. Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria spp.*, *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Metarhizium anisopliae* (Pucheta Díaz et al., 2006).

Este compuesto ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los hongos entomopatógenos puede ser un elemento que coadyuve a la solubilización de la proteína cuticular (Pucheta Díaz et al., 2006).

Otro compuesto importante producido por algunos hongos entomopatógenos entre los que destaca *Paecilomyces spp.* y *M. anisopliae* es el ácido 2,6-piridindicarboxílico, que posee propiedades insecticidas contra larvas de *Calliphora erythrocephala* (Pucheta Díaz et al., 2006).

También se han descrito toxinas peptídicas cíclicas y lineales. A las primeras pertenece una familia de péptidos conocidos como depsipéptidos. El primer compuesto de esta naturaleza en ser caracterizado fue la beauvericina, extraída del micelio de *Beauveria bassiana*, y posteriormente se han aislado de diferentes especies de *Fusarium* y *Paecilomyces* (Logrieco et al., 1998).

Otros depsipéptidos son las eniatinas aisladas de *Fusarium*, que son tóxicas contra larvas de *Choristoneura fumiferana*. La acción insecticida de estos depsipéptidos es específica para ciertos grupos de insectos y su toxicidad se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos, entre los que se incluye la beauvericina. La beauvericina es sintetizada de manera similar a las eniatinas y en su biosíntesis interviene una enzima multifuncional conocida como eniatina sintetasa cuya expresión es constitutiva (Pucheta Díaz et al., 2006).

Dos ciclotetrapéptidos muy parecidos denominados beauverólidos H e I fueron aislados del micelio de *B. bassiana* y *B. brogniarti*, aunque no tuvieron actividad insecticida contra *Melolontha melolontha* (Pucheta Díaz et al., 2006)

También se aislaron beauverólidos L y La del micelio de *Beauveria tenella* y *Paecilomyces fumosoroseus*, estos compuestos tienen una fuerte acción inmunomoduladora pero no un efecto insecticida (Jegorov et al., 1994).

Otro metabolito aislado de *B. bassiana* y *L. (V.) lecanii*, conocido como basianólido, mostró una fuerte acción insecticida tanto por ingestión como por inyección contra larvas de gusanos de seda *Bombix mori* (Pucheta Díaz et al., 2006).

Algunos aislados de *M. anisopliae* producen las llamadas destruxinas, de las que la dimetildextruxina y la protodextruxina están relacionadas con la virulencia (Kershaw y Talbot, 1998; Gillespie y Claydon, 1989; Monzón, 2001).

Las destruxinas son los compuestos mejor caracterizados, ya que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos. Además, las destruxinas son capaces de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de Malpighi en *Schistocerca gregaria* (Pucheta Díaz et al., 2006).

Las destruxinas A, B y E producidas por *M. anisopliae*, mostraron propiedades insecticidas al ser probadas en larvas de *Plutella xylostella*, así como en larvas y adultos de *Phaedon cochleariae*, con un nivel de mortalidad alto en las poblaciones de insectos;

además, causaron deformaciones en los élitros y alas anteriores del insecto (Amiri et al., 1999).

El mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos es muy complejo y además es altamente especializado y que la relación insecto-hongo es fundamental, siendo ambos organismos activos. Conocer más sobre este mecanismo contribuirá a la búsqueda de cepas con características especiales y a establecer condiciones de proceso que permitan la obtención de esporas con mayor virulencia hacia determinado insecto plaga, sin descartar la posibilidad de utilizar esporas y metabolitos, o bien solo los metabolitos con mayor actividad insecticida (Pucheta Díaz et al., 2006).

1.2.5. Principales plagas en cultivos de invernadero

Los enemigos naturales constituyen uno de los desafíos que tiene la agricultura, los más importantes a nivel hortícola bajo abrigo en Almería son la mosca blanca, trips, pulgones, araña roja, minadores, orugas, polilla del tomate y la mosca esciárida.



Figura 3. Mosca blanca en distintos estadios.

Bemisia tabaci y *Trialeurodes vaporariorum* conocidos vulgarmente como “moscas blancas” son pequeños insectos polífagos, que causan graves daños tanto en cultivos hortícolas como ornamentales a nivel mundial. Se estima que esta familia cuenta con más de 1200 especies descritas (Moreno Vicente, 2018)



Figura 4a y 4b. Planta de pimiento parasitada por pulgón.

Los pulgones pertenecen a la familia de insectos *Aphididae* y al orden Hemiptera. Son parasitoides de plantas angiospermas, aquellas que tienen flores y producen frutos con semillas (Jiménez Pérez, 2015).

Podemos encontrar cuatro mil especies en todo el mundo y en España se citan 386. De todas las especies existentes en el mundo, solo el 1% son muy dañinas y se consideran plagas (Jiménez Pérez, 2015).

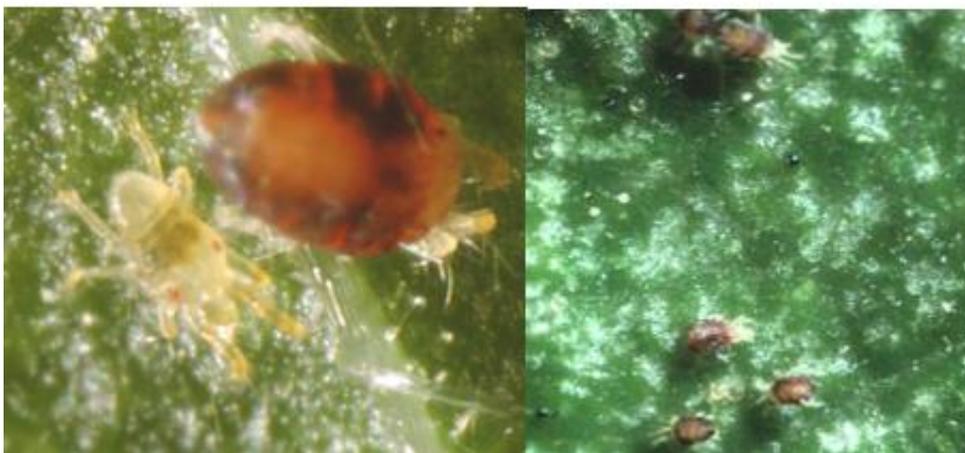


Figura 5. Macho y hembras adultas de *Tetranychus urticae*. (Archivo Unidad docente de Entomología, Universidad Politécnica de Valencia). Fuente (Gómez Moya, C., 2007).

En la producción de hortalizas una de las plagas más importantes, tanto en invernadero como al aire libre, son los ácaros del género *Tetranychus*. Los ácaros de este género son endémicos de todo el litoral mediterráneo, muy conocidos por su presencia sobre los cultivos hortícolas, frutales, cítricos y viñedos. En el litoral mediterráneo

El primer estadio larvario dura de 1 a 2 días; luego, después de la muda, comienza el segundo estadio larvario que dura de 2 a 4 días. Mientras están en estas dos etapas, los trips comen vorazmente, gracias al uso de su mandíbula para perforar la célula de la planta e insertar un estilete que extrae el contenido de la célula (Buechel, 2020).

Etapas	Duración aproximada de 20 a 37°	Ubicación*	¿Daños en planta?
Huevo	2 a 4 días	Hojas jóvenes y flores	No
Primer estadio	1 a 2 días	Hojas jóvenes, flores y frutos	Sí
Segundo estadio	2 a 4 días	Hojas jóvenes, flores y frutos	Sí
Etapas prepupal	1 a 2 días	Suelo/sustrato	No
Etapas pupal	1 a 2 días	Suelo/sustrato	No
Adultos	30 a 45 días	Hojas jóvenes, flores y frutos	Sí

Tabla 3. Duración de cada etapa del ciclo de vida de los trips. *Esta es una guía general que se aplica a la mayoría de las especies de trips. Fuente (Buechel, 2020).

Según la especie, se alimentan a base de pétalos de flores, polen, frutos jóvenes u hojas nuevas y tiernas en los extremos terminales de los tallos. Son muy difíciles de ver, ya que se esconden muy bien y son más pequeños que los adultos (Buechel, 2020).

Al final del segundo estadio larvario, los trips se reubican en el sustrato. Mientras están ahí, los trips pasan por una etapa prepupal donde comienzan a desarrollar los esbozos alares. Esta etapa dura 1 a 2 días. La siguiente etapa es la etapa de pupa, donde se desarrollan las alas, que constan de pelos largos y poco densos, los que dan un aspecto similar a una pluma. La etapa de pupa dura de 1 a 3 días hasta que las alas se desarrollan completamente, y luego emergen del sustrato como adultos. Durante las etapas de prepupa y pupa en el sustrato, los trips están inactivos y no se alimentan de la planta ni le causan daños a esta (Buechel, 2020).

Los adultos emergentes vuelan desde el sustrato para alimentarse de flores, hojas jóvenes, polen o frutos jóvenes en desarrollo. Los adultos viven de 30 a 45 días, causando daño a las partes de la planta desde donde se alimentan, mientras que las

hembras depositan los huevos dentro de los tejidos de la planta. El ciclo de vida de los trips es de 21 días o menos, si las temperaturas son altas. Las hembras pueden poner de 150 a 300 huevos, según la especie. Una vez que la temperatura baja, algunos trips pueden hibernar como huevos en la hojarasca o el suelo fuera del invernadero o bajo las bancas dentro del invernadero (Buechel, 2020).



Figura 7. Trips adultos y daño en hoja.

1.2.6.1. Trips más comunes en cultivos de invernadero en todo el Mundo.

Las especies más comunes y destructivas de trips que infestan los cultivos de invernadero son las siguientes (Buechel, 2020):

- *Frankliniella occidentalis* (se hablará más detalladamente en el punto 1.2.8.).
- *Thrips tabaci*: Tienen un color café amarillento uniforme.
- *Scirtothrips dorsalis*: Son de color verde pálido a amarillo, con alas oscuras y más pequeños que otros trips.
- *Hercinothrips femoralis*: Pupas en tejido de la planta, no en el suelo o el sustrato.

- *Echinothrips americanus*: Además de colocar las pupas en el tejido de la planta, son de color café oscuro, con una banda blanca en la parte posterior y en la base de las alas. Generalmente se alimentan solo de hojas.

1.2.6.2. Daño causado.

Ya que los trips se alimentan generalmente de células individuales, estas células vacías colapsan, lo que causa manchas o motas plateadas en las superficies del tejido. Si la alimentación continúa, puede provocar deformación en flores, hojas y escapos. En los frutos, puede producir una pequeña cavidad, seguido de una aureola blanca que rodea esa cavidad. En algunos frutos, la alimentación puede provocar finalmente un tejido seco con aspecto de corcho (Buechel, 2020).

Quizás una inquietud mayor es la transmisión de virus durante la alimentación. Por ejemplo, los trips occidentales de las flores transmiten dos tospovirus sumamente destructivos: el virus de la mancha necrótica de *Impatiens* y el virus del bronceado del tomate. Se sabe que estos dos virus afectan más de 600 especies de plantas (Buechel, 2020).

1.2.6.3. Fuentes de trips.

Los trips son difíciles de controlar ya que se pueden encontrar en cultivos o malezas fuera de un invernadero. Los trips pueden entrar al invernadero en esquejes, plántulas, cultivos prefinalizados y ropa de trabajo, o pueden entrar desde el exterior desde fines de la primavera hasta el otoño (Buechel, 2020).

Las malezas o los cultivos de campo cerca de un invernadero pueden tener grandes cantidades de trips, especialmente aquellos florecidos. Esto es especialmente preocupante si se cosecha el cultivo o se cortan las malezas con flores, ya que los trips buscan nuevas plantas huésped (Buechel, 2020).

Aunque muchas especies de trips que infestan los cultivos de invernadero pasan parte de su ciclo de vida en el suelo o el sustrato, esto no significa que el sustrato sea la fuente de los trips. De hecho, es muy poco probable que los trips aparezcan en sustratos empacados sin utilizar (Buechel, 2020).

Sin embargo, si se introdujeron trips de alguna forma al sustrato sin usar en las etapas de prepupa y pupa (que dura de 2 a 4 días), los adultos que emergerán no tendrán una fuente de alimento y morirán. Si había huevos, las temperaturas tibias de almacenamiento podrían estimular la eclosión y las ninfas nuevamente no tendrán una fuente de alimento dentro del envase y morirán (Buechel, 2020).

1.2.7. *Frankliniella occidentalis*.



Figura 8: *Frankliniella occidentalis* adulto. Fuente (Agriculturers. Red de especialistas en agricultura, 2014)

Frankliniella occidentalis es un insecto pequeño y alargado cuyo tamaño oscila entre los 0,8 y los 1,4 mm y están activos en un rango de 10 a 32 °C, pero el rango óptimo es de 27 a 30 °C. Los trips no se desarrollan a temperaturas bajo los 10 °C (Buechel, 2020).

El trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis*) atraviesa seis estadios: huevo, dos estadios larvales, prepupa, pupa y, por último, insecto adulto. El huevo del trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis*) se pone en las hojas, pétalos y en las partes blandas de los tallos. Se introducen en el tejido vegetal mediante un ovipositor parecido a una sierra (Koppert Biological Systems, s.f.).

Las larvas son de un color que va del blanco o amarillo transparente al naranja-amarillo y tienen una cabeza grande con ojos rojos brillantes. Las hembras adultas tienen colores muy variados, van del casi blanco y naranja amarillento al casi negro (Koppert Biological Systems, s.f.).

Los trips occidentales de las flores (*Frankliniella occidentalis*) suelen pupar en el suelo, aunque también se pueden encontrar pupas en las hojas, en las flores o en otros lugares protegidos. Las prepupas y pupas se reconocen por sus esbozos alares en su fase inicial de desarrollo. En comparación con la prepupa, la pupa tiene unos esbozos alares

más largos y desarrollados y unas antenas más largas que se curvan hacia atrás por encima de la cabeza. Los estadios de prepupa y pupa no se alimentan. En los adultos ambos pares de alas están totalmente desarrollados (Koppert Biological Systems, s.f.).

Los trips dañan las plantas al perforar las células de los tejidos superficiales y succionar su contenido, causando la muerte del tejido circundante. Las manchas gris plata y los puntos negros de sus excrementos delatan su presencia en el cultivo. Disminuye la vigorosidad de la planta debido a la pérdida de clorofila. Si la infestación es grave, las hojas pueden arrugarse (Koppert Biological Systems, s.f.).

Los trips occidentales de las flores (*Frankliniella occidentalis*) prefieren alimentarse de los tejidos vegetales en desarrollo, tales como las yemas apicales y las florales. El posterior desarrollo de los tejidos provoca una grave deformación de las hojas y flores e incluso provocar que las yemas florales ni siquiera se abran (Koppert Biological Systems, s.f.).

Los frutos también pueden sufrir daños, incluso a bajas densidades, produciéndose malformaciones como la ondulación del fruto que a veces se observa en los cultivos de pepino. En muchos cultivos ornamentales, incluso un número reducido de trips puede causar daños, al transmitir virus o disminuir su valor estético al dañar las flores, ej. las rosas (Koppert Biological Systems, s.f.).

El trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis*) es el principal vector del virus de la marchitez del tomate (ToMarV) y del virus de la necrosis apical del tomate (ToANV). Ambos virus afectan a un amplio rango de plantas y, a menudo, una sola planta huésped puede presentar ambos virus (Koppert Biological Systems, s.f.).

1.2.8. Hongos entomopatógenos más usados contra los tisanópteros.

1.2.8.1. *Beauveria bassiana*



Figura 9. Afidio infectado por *Beauveria bassiana*. Fuente (Solagro. Soluciones Agrosostenibles, s.f.)

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno que ha sido utilizado para contralar trips.

Pertenece a la clase Deuteromycetes, que se les conoce también como hongos imperfectos. El hongo penetra el insecto principalmente por la cutícula, siendo esta la ruta más directa, aunque también puede ingresar por la boca o el ano. Una vez el hongo está dentro del insecto, ocurre la germinación de las conidias que penetran por acción mecánica y efectos enzimáticos al integumento del insecto, donde posteriormente pasa a la hemolinfa donde ataca los tejidos (Castillo et al., 2012).



Figura 10. *Beauveria bassiana* en placa Petri. Fuente (Indiamart. Insecticides and Pesticides, s.f.)

En un estudio *Beauveria* y *Metarhizium* fueron aplicados contra trips en invernadero. El control dependía mucho de condiciones de humedad del invernadero (Wraight et al., 2016).

Humedades Relativas mayores o iguales al 80% después de las pulverizaciones fueron la predicción más fuerte para el control de la plaga (Wraight et al., 2016).

Concretamente, manteniendo al 80% HR durante 35 horas después de haber realizado las pulverizaciones se logró un 70% de control de la plaga (Wraight et al., 2016).

Se realizaron bioensayos de laboratorio de tres hongos entomopatógenos (cepa *Beauveria bassiana* GHA, cepa *Metarhizium brunneum* F52 y *Metarhizium anisopliae* s.l. cepa ESC-1) contra ninfas de segundo estadio de *Frankliniella occidentalis*. Los tres hongos fueron altamente virulentos, con LC50 (la concentración que hace que el 50% de los individuos se mueran) respectivos de 193, 140 y 72 conidios / mm² de superficie de la hoja tratada (Wraight et al., 2016).

1.2.8.2. *Paecilomyces fumosoroseus* / *Isaria fumosorosea*



Figura 11. Insecto colonizado por *Paecilomyces fumosoroseus*. Fuente (Control Bío, s.f.)

Isaria fumosorosea (especie) también denominado *Paecilomyces fumosoroseus* es un hongo entomopatógeno que afecta diferentes órdenes de insectos como ser: Acarí, Coleóptera, Díptera, Hemíptera y entre ellas el orden Hymenoptera al cual pertenecen los trips (Gandarilla, 2012).

Este hongo pertenece a la subdivisión deuteromicotina, a los que se les conoce como hongos imperfectos. Su reproducción es por medio de esporulación que ocurre en condiciones de alta humedad (Mendoza y Toledo, 2019).

El mecanismo de acción de este hongo (por contacto) destaca la producción de enzimas principalmente quitinasas, quitobiasas, proteasas, lipasas y lipooxigenasa. Estas enzimas provocan la degradación de la cutícula del insecto y ayudan en el proceso de penetración (Mendoza y Toledo, 2019).

Se realizó un estudio para ver la capacidad de *Isaria Fumosorosea* contra adultos de *F. occidentalis* (Mendoza y Toledo, 2019).

Al evaluar los resultados de las aplicaciones con los hongos entomopatógenos se observa que tres días después de la primera aplicación hubo una reducción en la población promedio de trips/planta en todos los tratamientos, excepto por el testigo (Mendoza y Toledo, 2019).

El tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de reducción con respecto a la población inicial fue *I. fumosorosea* 1×10^{11} con un promedio de 12.4 trips/planta, el cual representa un 27% de reducción (Mendoza y Toledo, 2019).

El bajo porcentaje de reducción de la población inicial se puede atribuir a que la temperatura tres días antes de realizar el muestreo fue en promedio de 36 °C, lo cual

pudo afectar el desarrollo de los hongos. La temperatura promedio para el desarrollo de los hongos entomopatógenos es entre 25 °C y 30 °C (Mendoza y Toledo, 2019).

Tres días después de la tercera aplicación, el tratamiento de *I. fumosorosea* 1×10^{11} obtuvo un promedio de 9.8 trips/planta, representando 42% de reducción (Mendoza y Toledo, 2019).

En el último muestreo el tratamiento de *I. fumosorosea* 1×10^{12} obtuvo un porcentaje de reducción de 63% con un promedio de 6.8 trips/planta (Mendoza y Toledo, 2019).

I. fumosorosea 1×10^{12} obtuvo los mayores porcentajes de mortalidad respecto al testigo, pero no diferentes de *I. fumosorosea* 1×10^{11} (Mendoza y Toledo, 2019).

1.2.8.3. *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*



Figura 12. *Verticillium lecanii* atacando ninfas de la cochinilla de la tizne. Fuente (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, s.f.)

Lecanicillium (Verticillium) lecanii es un hongo entomopatógeno, aislado de insectos que padecen enfermedades. Ahora, es un recurso de control biológico efectivo que puede controlar plagas agrícolas como la mosca blanca, trips y los pulgones (Xie et al., 2019).

La clasificación taxonómica de *L. lecanii* es la siguiente (Vargas Tenorio, 2017):

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Género: *Lecanicillium*

Especie: *L. lecanii*

Lecanicillium lecanii posee una amplia distribución mundial, desde Asia, Europa, América y algunas islas del Caribe. Este hongo ha sido aislado de sustratos como suelo, otros hongos, así como de insectos en todas sus etapas de desarrollo (Vargas Tenorio, 2017).

Lecanicillium lecanii puede crecer en un ámbito de temperatura entre 4°C y 30°C sin presentar crecimiento a más de 35°C (Vargas Tenorio, 2017).

El crecimiento óptimo del hongo, así como su mayor tasa de infección se presenta alrededor de los 25°C (Vargas Tenorio, 2017).

La humedad relativa óptima para la germinación de los conidios se encuentra en valores muy altos (90-95%) (Vargas Tenorio, 2017).

Estas condiciones son críticas en las etapas iniciales de germinación, sin embargo, no son tan determinantes en lo que respecta a invasión, perforación y penetración del hongo, debido a que estas etapas se pueden realizar en condiciones de humedad relativamente bajas (Vargas Tenorio, 2017).

El modo de acción es por contacto. Una vez que las esporas de *Lecanicillium lecanii* entran en contacto con el patógeno se da una liberación de enzimas, como la β -1,3-glucanasa, quitinasas, amilasas y proteasas, las cuales causan alteraciones en las paredes celulares del hospedero, permitiendo que las hifas de penetración de *Lecanicillium lecanii* ingresen (Vargas Tenorio, 2017).

Posteriormente ocurre una desorganización del citoplasma en las células del patógeno, debido a la pérdida de turgencia de las células y contorsión de la pared celular (Vargas Tenorio, 2017).

Por último, las células atacadas colapsan, reduciendo su protoplasma debido a la extensa multiplicación del antagonista y al estar totalmente rodeado por este (Vargas Tenorio, 2017).



Figura 13. Crecimiento de *Verticillium lecanii*. Fuente (Cheah, C., Reardon, R. C. y Onken, B., 2004).

En un estudio se expusieron ninfas de *B. tabaci* a conidias de *L. lecanii* JMC-01 por inmersión con el cultivo huésped (Xie et al., 2019).

La mortalidad se evaluó diariamente para todas las etapas de la ninfa. Los cambios de actividad enzimática desintoxicante y protectora, los cambios de peso y el contenido de grasa y agua de las ninfas se determinaron por espectrofotometría.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron que todos los estadios de *B. tabaci* murieron después de haber sido infestados con 1×10^8 conidios / ml (Xie et al., 2019).

Las ninfas de segundo estadio fueron las más susceptibles, seguidas por las ninfas de tercer estadio. La mortalidad acumulada corregida de las ninfas del segundo y tercer estadio fue del 82,22% y del 75,55%, respectivamente. Los niveles de enzimas desintoxicantes y protectoras inicialmente aumentaron y luego disminuyeron (Xie et al., 2019).

Por lo tanto, la cepa de *L. lecanii* JMC-01 estudiada es patógena para *B. tabaci*. Esta cepa interfiere con el funcionamiento normal de las enzimas desintoxicantes y protectoras, y también está involucrada en la alteración del metabolismo fisiológico normal en *B. tabaci* (Xie et al., 2019).

1.2.8.4. *Metarhizium anisopliae*



Figura 14. Insecto colonizado por *Metarhizium anisopliae*. Fuente (EcuRed, s.f.)

Metarhizium anisopliae es un bioinsecticida utilizado ampliamente para parasitar a una gran variedad de insectos entre los que se encuentra *Frankliniella occidentalis*.

Se investigó la patogenicidad de varios aislados de los hongos hifomicetos *Verticillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* frente a *Frankliniella occidentalis* (Vestergaard et al., 1995).

El tratamiento de trips adultos con *M. anisopliae* resultó en al menos un 94% de mortalidad a los 7 días después de la inoculación. A diferencia de *V. lecanii* los aislamientos solo dieron mortalidades de entre 20 y 70% (Vestergaard et al., 1995).

Tanto *M. anisopliae* como *V. lecanii* fueron patógenas para *F. occidentalis*, siendo esta patogenicidad independiente del país de origen (Vestergaard et al., 1995).

Todos los aislados de *M. anisopliae* causaron mortalidades superiores al 94% dentro de los 7 días posteriores a la inoculación. Por el contrario, los aislados de *V. lecanii* fueron de débil a moderadamente virulentos, causando 20-70% mortalidad (Vestergaard et al., 1995).

Las primeras muertes normalmente ocurrieron en el segundo día para ambas especies de hongos, pero la tasa de infección fue mayor para *M. anisopliae* que para *V. lecanii* (Vestergaard et al., 1995).

Hubo poca variación dentro de las repeticiones y entre repeticiones de experimentos para la mayoría de los tratamientos. Controlan la mortalidad en los primeros 5 días, pero rara vez excedió el 10%. Sin embargo, para el día 7 aumentaron al 11-16%, probablemente debido a mortalidad natural (Vestergaard et al., 1995).

Los insectos infectados con *M. anisopliae* (2-3 días después de la inoculación) exhibieron dos tipos inusuales de comportamiento, contracciones de las piernas y arqueamiento del abdomen. Ninguno de estos síntomas se observó en controles o insectos infectados con *V. lecanii*. Tanto *V. lecanii* como *M. anisopliae* emergieron de cadáveres aproximadamente 2 días después de la muerte y esporulado profusamente (Vestergaard et al., 1995).

Los aislados de *M. anisopliae* fueron mucho más virulentos para *F. occidentalis* que los de *V. lecanii*, y esta virulencia era independiente del huésped o país de origen del que derivaron (Vestergaard et al., 1995).

FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA ASOCIADO

2. FASES DE REALIZACIÓN Y CRONOGRAMA ASOCIADO

Para la realización de este trabajo se han llevado a cabo una serie de procedimientos cuyo objetivo final es el de evaluar la capacidad de control sobre el trips *Frankliniella occidentalis* de 7 hongos entomopatógenos no caracterizados previamente. Con el propósito de obtener unos resultados finales que permitan llegar a una conclusión basada en pruebas empíricas, se han ido realizando una sucesión de procesos que se describirán a lo largo del presente trabajo.

Atendiendo al modo de trabajo, cambios de estadio del insecto, los procedimientos seguidos, así como los objetivos particulares, se han definido once fases de trabajo para la realización de las operaciones, permitiendo una mejor planificación y organización de los procesos:

0. Diseño, planificación y fijado de objetivos del trabajo a realizar. (13/01/2020).
 - a. Revisión bibliográfica.
 - b. Realización del Anteproyecto.

1. Preparación del medio de cultivo en placas Petri (15/01/2020). (E-CB08)

2. Selección y aislamiento de los 7 hongos no descritos. (PAE, Cont, 11H, CI, H1, TA, TS). (16/01/2020)
 - a. Sembrado de los 7 hongos entomopatógenos en las placas Petri. (E-CB08, E-CA02)

3. Preparación de las semillas y esterilización del sustrato (20/01/202019).
 - a. Producción de plántulas de pepino (variedad Wisconsin). (E-CB08, E-CA02)
 - b. Elaboración del sustrato (mezcla de turba con vermiculita). (E-CB08, E-CA02)
 - c. Esterilización del sustrato en el autoclave. (E-CB08, E-CA02)

4. Dilución de esporas, preparación de los recipientes donde se colocarán las semillas y acoplamiento del invernadero (22/01/2020).

a. Extracción de las esporas de los 7 hongos entomopatógenos y dilución de las mismas. (CTH01, CTH05)

b. Limpieza y desinfección de los recipientes en lejía y agua. (E-CB08, E-CA02)

c. Preparación del sustrato en los botes y siembra de las semillas a un volumen de 60 mL. (CTH01, CTH05)

d. Montaje del invernadero y puesta de los recipientes en bandejas dentro del invernadero. (E-CA07)

e. Montaje de luces y de registrador de temperatura ELUSB 2 Lascar. (E-CA07)

5. Inoculación de los 7 hongos entomopatógenos en el **sustrato** (24/01/2020).

a. Aporte de los 7 patógenos (10^6 esporas/planta, menos en el caso de Cl y PAE que fueron 10^5 debido a que generó fitotoxicidad en las plantas) con jeringa al sustrato de los recipientes sembrados. (CTH01, CTH05)

b. Riego sin tratamiento al testigo. (E-CB08, E-CA02)

6. Eliminación de las plántulas muertas o inviables y riego de todos los recipientes por inundación en las bandejas (27/01/2020). (E-CB08, E-CA02)

7. Pulverización a los cotiledones (**foliar**) de los distintos aislados fúngicos con una dosis de 100000 esporas/planta. (30/01/2020). (CTH01, CTH05)

8. Recogida en campo de *Frankliniella occidentalis* (31/01/2020).

a. Incorporación masiva de adultos de *F. occidentalis*. (E-CB08, E-CA02)

b. Desarrollo del insecto hasta alcanzar la fase de pupa en suelo. (E-CB08, E-CA02)

9. Realización de dos determinaciones distintas (19/02/2020):

a. Observación de la presencia de estados larvarios y huevos sobre 18 cotiledones por tratamiento (**vía foliar**) cuando el número de grados día acumulados sea próximo a 202. (CTH01, CTH05)

b. La segunda determinación se realizará sobre 244 plantas, 144 del tratamiento **foliar** y 144 del tratamiento al **sustrato**. (CTH01, CTH05)

10. Se cortaron las plantas cuando el número de grados día acumulados fue próximo a 264. (24/02/2020)

a. Corte de cotiledones y conteo de larvas y adultos en cotiledones y pequeñas hojas verdaderas (recipientes naranjas). (E-CB08E-CA02)

b. Se taparán los recipientes/maceteros rojos con una tapa que posee un tozo placa cromotrópica amarilla para la captura de los adultos. (E-CB08, E-CA02)

11. Procesamiento de datos y realización del informe con los resultados obtenidos. (11/05/2020)

a. Tras una semana a temperatura constante de 23°C en estufa y con fotoperiodo de 16:8 horas de luz-oscuridad, se procederá contar los adultos de trips emergidos. (CTH01, CTH05)

b. Se procesarán los datos con el programa Excel 19.0, tras lo cual se realizará un análisis de la varianza ANOVA factorial, para proseguir con un ANOVA simple y test de separación de medias mediante el método LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) (Fisher, 1925). Finalmente, el test no se llevó a cabo y se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, pues los datos obtenidos no fueron los previstos inicialmente (Kruskal et al., 1952). (E-CB01)

Los códigos asociados a las tareas desarrolladas en cada fase de realización corresponden con las competencias adquiridas durante el progreso académico.

Estos códigos están definidos como se presenta a continuación:

E-CB01– Capacidad para la resolución de los problemas matemáticos que puedan plantearse en la ingeniería. Aptitud para aplicar los conocimientos sobre: álgebra lineal;

geometría; geometría diferencial; cálculo diferencial e integral; ecuaciones diferenciales y en derivadas parciales; métodos numéricos, algorítmica numérica; estadística y optimización.

E-CB08– Conocimiento de las bases y fundamentos biológicos del ámbito vegetal y animal en la ingeniería.

E-CA02– Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Las bases de la producción vegetal, los sistemas de producción, de protección y de explotación.

E-CA07– Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Ingeniería del medio rural: cálculo de estructuras y construcción, hidráulica, motores y máquinas, electrotecnia, proyectos técnicos.

CTH01 – Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Tecnología de la Producción Hortofrutícola: Bases y tecnología de la propagación y producción hortícola, frutícola y ornamental. Control de calidad de productos hortofrutícolas. Comercialización. Genética y mejora vegetal

CTH05 – Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Material vegetal: producción, uso y mantenimiento.

ESPECIFICACIONES Y REQUERIMIENTOS

3. ESPECIFICACIONES Y REQUERIMIENTOS TÉCNICOS

El ensayo fue realizado en tres laboratorios diferentes del área de Producción vegetal, localizados en la Universidad de Almería. Estos están situados en la Escuela Superior de Ingeniería.

En la siguiente parte se describirán de forma detallada los materiales, procedimientos y herramientas utilizadas para el desarrollo del ensayo. Así como los parámetros necesarios para evaluar y caracterizar de manera objetiva los resultados obtenidos.

3.1. Materiales

3.1.1. Material de laboratorio

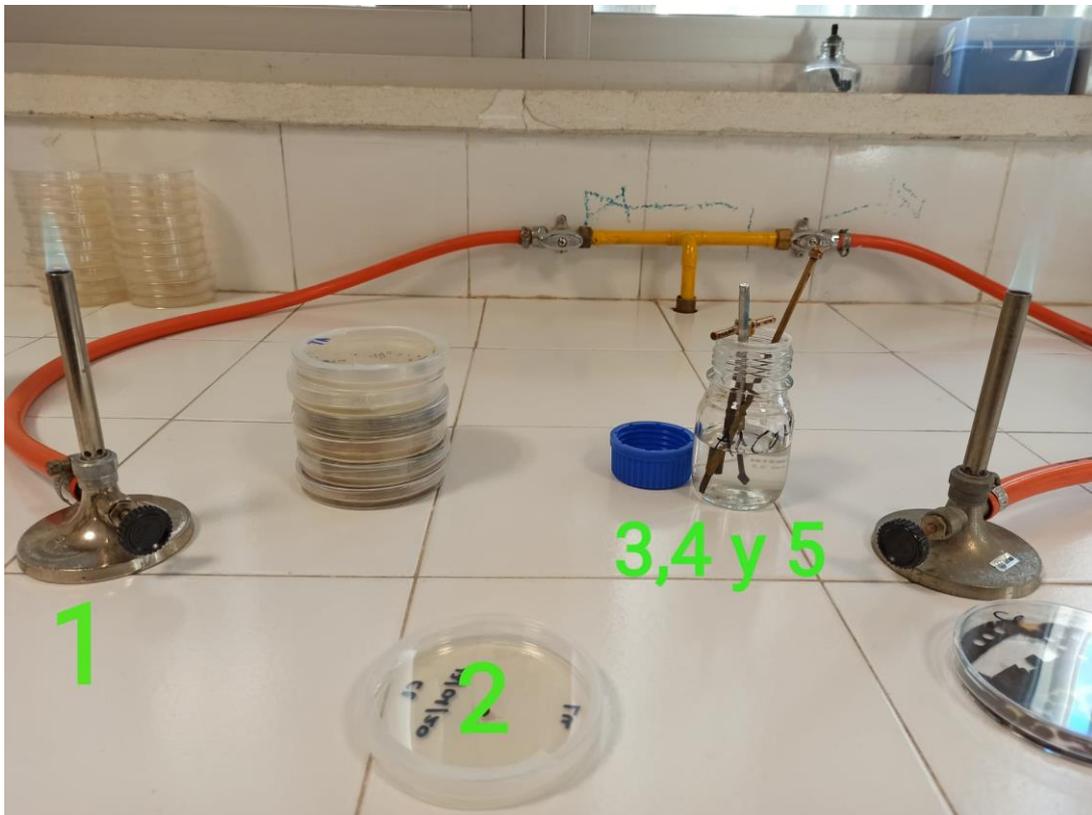


Figura 15. Material de laboratorio

1. Mechero Bunsen
2. Placa Petri con PDA envuelta en parafilm
- 3, 4 y 5. Sacabocados, lanceta y bote con alcohol para desinfección

3.1.2. Medio de cultivo



Figura 16a. PDA (Agar papa dextrosa) en bote

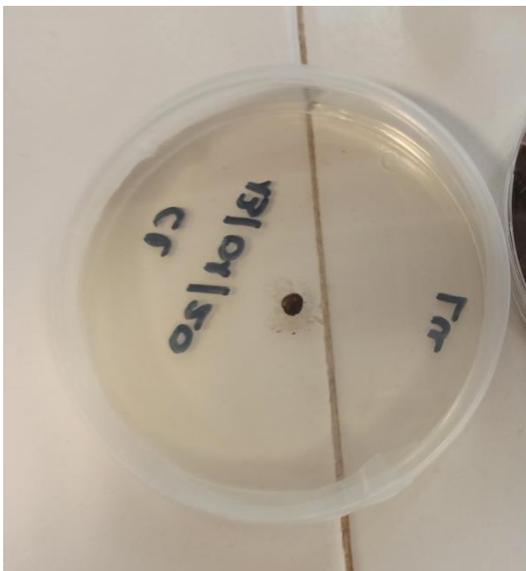


Figura 16b. Placa petri con medio de cultivo

El medio de cultivo empleado es el más común para cultivos microbiológicos (en nuestro caso hongos), denominado Agar-Papa-Dextrosa o PDA. En dicho medio es altamente nutritivo, con lo que permite el crecimiento de los hongos, levaduras y bacterias.

3.1.3. Hongos entomopatógenos empleados

Los hongos utilizados pertenecen al departamento de agronomía de la Universidad de Almería (UAL). Dichos hongos (siete en total) no están caracterizados aún, los aislados se codificarán con la siguiente nomenclatura: PAE, Cont, 11H, CI, TA, H1 y TS.

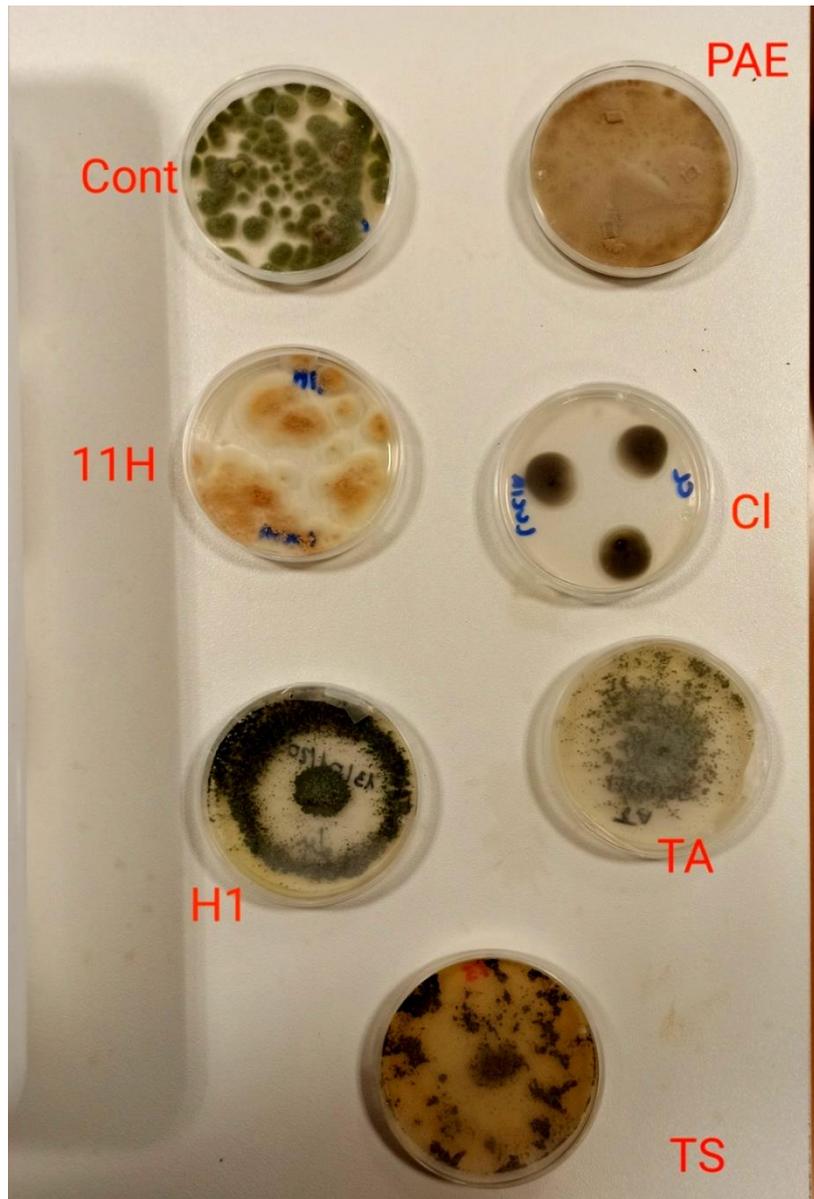


Figura 17. Hongos empleados

3.1.4. Material vegetal

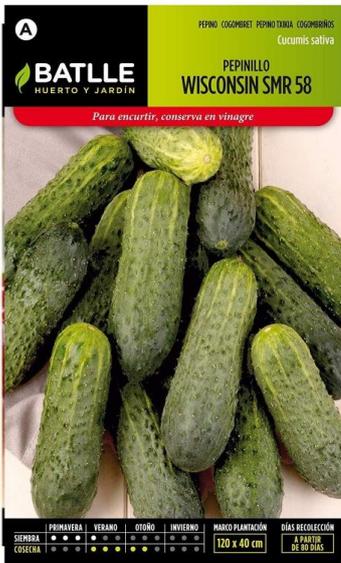


Figura 18. Semillas de pepino variedad Wisconsin. Fuente (Planeta semilla, s.f.)



Figura 19. Semillas de pepino Wisconsin en bandeja dispuestas para pregerminación en un medio húmedo

3.1.5. Material inocuo



Figura 20. Sustrato esterilizado: mezcla de turba con vermiculita al 70-30 respectivamente



Figura 21. Sustrato humedecido con agua

3.1.6. Otros

Autoclave, maceteros/recipientes rojos, bandejas, estufa, recipientes naranjas (donde se meterán los cotiledones cortados para conteo de larvas y adultos), invernadero, luces, placas cromotrópicas, registrador electrónico modelo ELUSB 2 Lascar la temperatura y humedad, lupa, microscopio, varillas esterilizadas, pulverizador y tijeras.



Figura 22. Autoclave



Figura 23. Maceteros/
recipientes rojos



Figura 24. Recipientes naranjas
y bandeja



Figura 25. Invernadero



Figura 26. Microscopio

3.2. Métodos

3.2.0. Esquema resumen de los recipientes/maceteros en el invernadero.



Figura 27. Esquema resumen del montaje del ensayo en el invernadero

Esta metodología se llevó a cabo con el fin de completar los tres ensayos con dos objetivos distintos. El ensayo I y II difieren en que la aplicación en un caso es foliar y otra en suelo, pero la metodología es la misma. Como se describe en el esquema se realizaron los siguientes tratamientos:

- ENSAYO I: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación en suelo/sustrato 144 plantas.
- ENSAYO II: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación foliar 144 plantas.

Los ensayos I y II se realizaron con la misma metodología, con el fin de primero, contabilizar el número de huevos, larvas y adultos en cotiledones (tanto en sustrato como foliar) previo a las fases de prepupa y pupa. Para ello se utilizaron recipientes naranjas donde se introdujeron los cotiledones y se numeraron las 18 plantas de cada tratamiento (tanto tratamiento foliar como en sustrato).

Segundo, realizar un conteo de la emergencia de adultos posterior a las fases de prepupa y pupa. Para ello, una vez que se cortaron los cotiledones y fueron a los recipientes naranjas, nos quedamos con el sustrato y todos los insectos que ya deberían de estar en el sustrato pupando. Dicho sustrato se tapó con una placa cromotrópica para capturar los adultos (una vez que se completaron los grados día en los que *F. occidentalis* emerge a la parte aérea), para así realizar un conteo de como cada tratamiento (hongo) afectó al trip y poder compararlo con un testigo, el cual carecía de tratamiento. Comparando la mortandad de *F. occidentalis* en cada aislado fúngico.

- ENSAYO III: 8 tratamientos x 9 plantas de aplicación foliar 72 plantas y 144 cotiledones.

En el ensayo III se comprobó y observó si la presencia de estados larvarios y huevos fue homogénea.

Para la realización de los tres ensayos, fue necesario la inoculación de los hongos, la plantación de las semillas de pepino, la puesta en marcha de todos los recipientes, la incorporación de trips y las distintas partes que se explican a continuación:

3.2.1. Preparación del medio de cultivo en placas Petri.

Para obtener el medio de cultivo de PDA (Agar-Papa-Dextrosa) se tomaron 20g de PDA por cada litro de medio de cultivo a preparar.

Se realizaron 7 placas de PDA por tratamiento (hongo) con el fin de asegurarnos tener cantidad suficiente de esporas.

3.2.2. Selección y aislamiento de los 7 hongos no descritos. (PAE, Cont, 11H, CI, H1, TA, TS).

a. Sembrado y producción de los 7 tratamientos (hongos) en las placas Petri, en siete repeticiones por tratamiento.



Figura 28a y 28b. Sembrado de hongos en placa Petri con PDA

3.2.3. Preparación de las semillas y esterilización del sustrato.

a. Producción de plántulas de pepino (variedad Wisconsin).

Se utilizó un pepino de la variedad Wisconsin. Para ello, se lavaron las semillas con una solución de agua con lejía al 4% durante 2 minutos, con la finalidad de desinfectarlas.

Posteriormente, se le dió un pase de agua para quitar el exceso de cloro durante otros 2 minutos.

Después se colocaron en una bandeja de plástico con un papel de filtro humedecido para que actúe como cámara húmeda durante la pregerminación.

b. Elaboración del sustrato (mezcla de turba con vermiculita).

Para la realización de un sustrato adecuado se utilizó una mezcla de turba con vermiculita al 70-30 respectivamente.

c. Esterilización del sustrato en el autoclave.

Por último, en este apartado, se esterilizó el sustrato en el autoclave durante 1 hora a 120°. En dicha parte realizamos dos ciclos, con el fin de asegurarnos la completa esterilización del sustrato.



Figura 29. Autoclave con bolsa de sustrato preparada para esterilizar

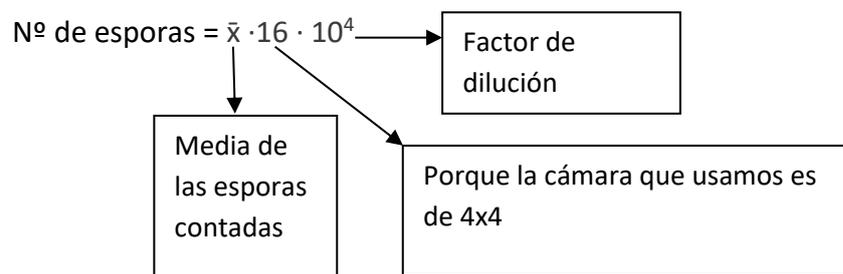
3.2.4. Dilución de esporas, preparación de los recipientes donde se colocarán las semillas y acoplamiento del invernadero.

a. Extracción de las esporas de los 7 aislados fúngicos y dilución de las mismas. La dosis empleada fue de 10^6 esporas/planta, menos en los hongos CI y PAE que fue a una concentración diez veces menor (10^5) debido a que se observó toxicidad en la planta.

Para ello, se extrajeron las esporas por cada hongo de las placas Petri y se metieron en recipientes de tapadera roja a concentración líquida con agua estéril.

En este proceso, primero se le añadió agua esterilizada y se hizo el rascado de las esporas con varillas esterilizadas.

Después para contar las esporas se utilizó un hematocitómetro tipo cámara de Neubauer en la que se empleó la siguiente fórmula:



Una vez que se supo la concentración inicial de esporas, se sacó la concentración final para que todas las concentraciones de todos aislados fúngicos fuesen la misma. Para finalizar usamos la siguiente ecuación:

$$V_i \cdot []_i = V_f \cdot []_f$$

V = volúmenes iniciales y finales

[] = concentraciones iniciales y finales

En dicha ecuación está la concentración inicial que es lo que acabamos de medir y también está la concentración final que es la que quisimos aplicar, también se supo el volumen final, que es el volumen que se necesitó para aplicar a todas las plantas, por lo que se sacó el volumen inicial (ese es el volumen inicial de solución madre de esporas, de la solución anterior), el resto hasta llegar al volumen final se le añade de agua esterilizada.



Figura 30a. Extracción de las esporas



Figura 30b. Dilución de las esporas

b. Limpieza y desinfección de los recipientes, primero en lejía y posteriormente en agua.

c. Preparación del sustrato (previamente esterilizada) en los recipientes rojos y siembra de las semillas a un volumen de 60 mL.

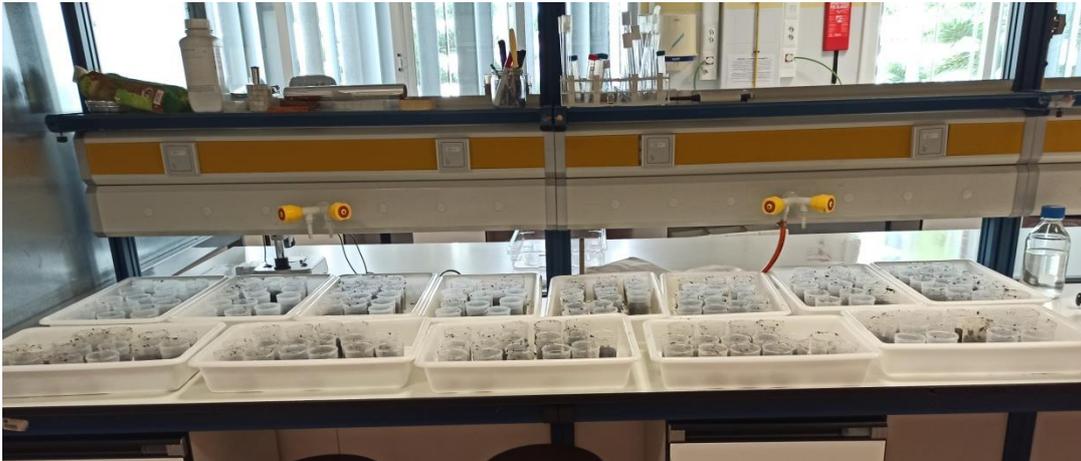


Figura 31. Preparación del sustrato en recipientes

d. Montaje del invernadero y puesta de los recipientes en bandejas dentro del invernadero.

e. Instalación de las luces y de registrador de temperatura ELUSB 2 Lascar.

3.2.5. Inoculación de los 7 hongos entomopatógenos en el sustrato.

a. Aporte de los 7 patógenos (10^6 esporas/planta, menos en el caso de Cl y PAE que fueron 10^5) con jeringa al sustrato de los recipientes sembrados. Este apartado se realizó solo sobre el ensayo I, que es el que se lleva a cabo sobre el sustrato.



Figura 32. Incorporación por riego de los aislados fúngicos al sustrato

b. Riego sin tratamiento al testigo.

3.2.6. Eliminación de las plántulas muertas o inviables y riego de todos los recipientes por inundación en las bandejas.

3.2.7. Pulverización a los cotiledones (foliar) de los distintos aislados fúngicos con una dosis de 100000 esporas por planta.

Este apartado se realizó sobre los ensayos II y III, que son a los cuales se les hizo una aplicación foliar.



Figura 33. Pulverización foliar de los hongos en los cotiledones

3.2.8. Recogida en campo de *Frankliniella occidentalis*.

- a. Incorporación masiva de adultos de *F. occidentalis*.

Se procedió a la recogida de trips en campo y se incorporaron en el invernadero.

- b. Se dejó el desarrollo del insecto en campo hasta alcanzar la fase de pupa en suelo.

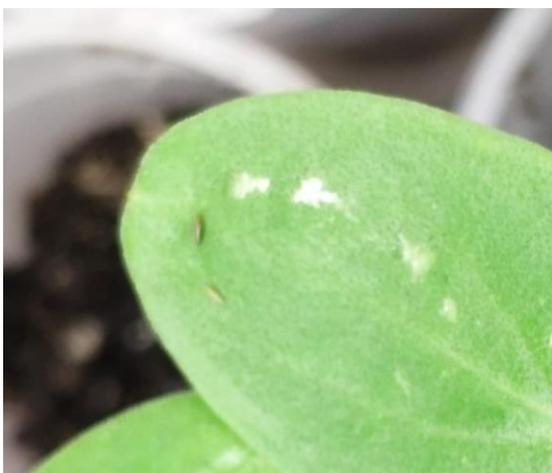


Figura 34. *F. occidentalis* adultos y daño por trip en cotiledones

3.2.9. Realización de dos determinaciones distintas.

- a. Observación de la presencia de estados larvarios y huevos sobre 18 cotiledones por tratamiento (**vía foliar**) cuando el número de grados día acumulados sea próximo a 202.

- b. La segunda determinación se efectuó sobre 244 plantas, 144 del tratamiento **foliar** y 144 del tratamiento al **sustrato**.

Para ello se realizó un conteo previo a las fases de pupa de cuantos individuos había justo antes del instante en el que el trip se lanzó al sustrato.

Posteriormente se contabilizó el número de adultos emergidos, con el fin de ver la mortandad de cada tratamiento con respecto a un testigo.

3.2.10. Realización del corte de las plantas cuando el número de grados día acumulados fue próximo a 264.

a. Corte de cotiledones y conteo de larvas y adultos en cotiledones y pequeñas hojas verdaderas. Se utilizaron recipientes naranjas donde se introdujeron los cotiledones y se numeraron las 18 plantas de cada tratamiento (tanto tratamiento foliar como en sustrato). Persiguiendo ver que cantidad hay de trip justo antes de lanzarse al suelo y como afectaron los distintos tratamientos a los individuos que hubo en el cotiledón. Si hubo colonización de hongos, si no la hubo y si hubo un mayor o un menor número de larvas o de adultos.



Figura 35a. Corte de cotiledones y puesta en recipientes de tapadera naranja



Figura 35b. Larva de *F. occidentalis* sobre cotiledón

b. Se taparon los recipientes/maceteros rojos con una tapa que posee un tozo placa cromotrópica amarilla para la captura de los adultos. En este apartado lo que

se persiguió es que, si una vez cumplidos los grados día para que *F. occidentalis* emerja, se pudiesen contabilizar el número de adultos que hubiese en cada tratamiento. Con este conteo lo que quisimos ver es como afectó cada aislado fúngico al insecto, que hongo causó mayor mortandad y sobre que vía hizo más estragos, vía foliar o vía sustrato.

3.2.11. Procesamiento de datos y realización del informe con los resultados obtenidos.

a. Tras una semana a temperatura constante de 23°C en estufa y con fotoperiodo de 16:8 horas de luz-oscuridad, se procedió contar los adultos de trips emergidos.

b. Se procesaron los datos con el programa Excel 19.0, tras lo cual finalmente se realizó un análisis ANOVA simple para los datos de larvas en foliar, larvas en sustrato, adultos en foliar y adultos en sustrato. No se hizo un análisis de varianza simple porque viola los supuestos que deberían de tener los datos para poder aplicar ANOVA. Lo que si se hizo es la prueba de Kruskal-Wallis, un análisis no paramétrico. En nuestro caso todos los valores fueron mayores de 0,05, dado que no hay diferencia entre las poblaciones obtenidas. (Kruskal et al., 1952).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente proyecto se evaluaron 7 distintos aislados fúngicos con el fin de poder controlar plagas en invernadero, más concretamente a *F. occidentalis*. El abuso de los plaguicidas nos ha llevado a la necesidad de emplear otros mecanismos como es la lucha microbiológica. De aquí surge la obligación de investigar y determinar que herramientas utilizaremos para un futuro más sostenible con el medio ambiente.

El ensayo se subdivide a la vez en los tres ensayos siguientes:

4.1. ENSAYO I: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación en suelo/sustrato 144 plantas.

A. Primera determinación y conteo de larvas y adultos en cotiledones previos a las fases de prepupa y pupa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Adultos:

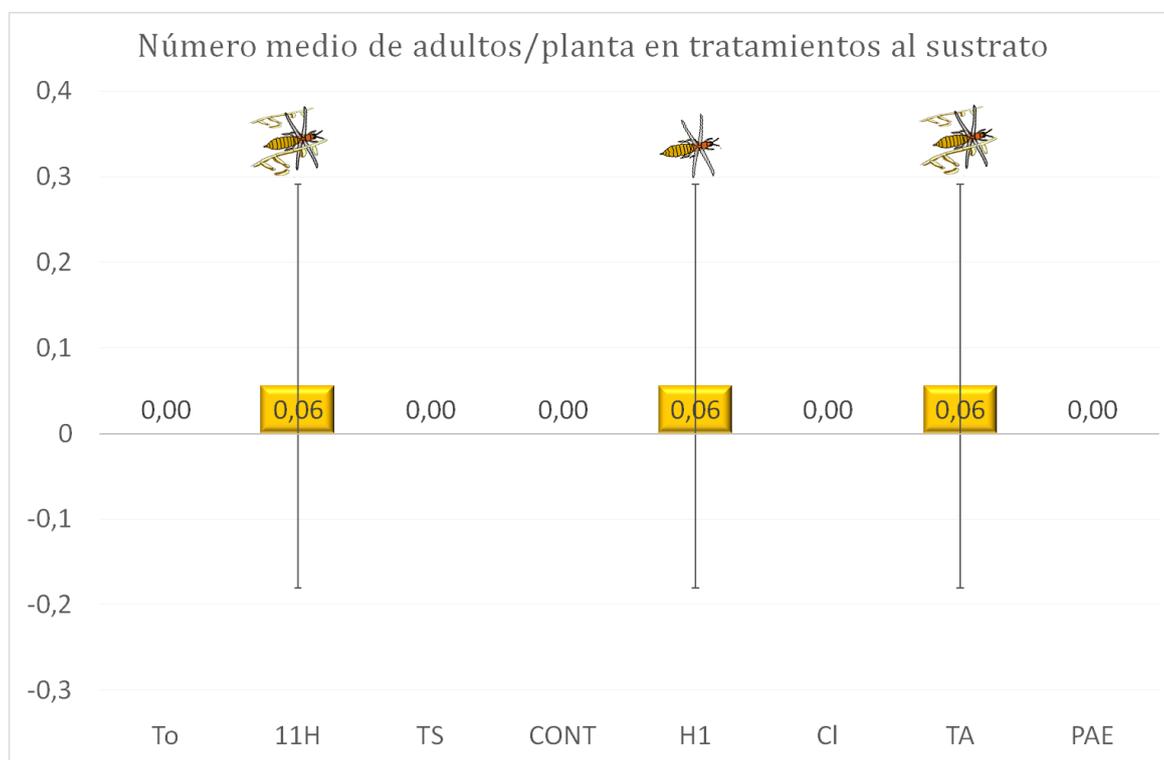


Gráfico 1. Número medio de adultos/planta en tratamientos al sustrato

Los datos corresponden al número medio de adultos/planta obtenidos para cada tratamiento.

Los resultados no se pueden analizar porque el número de individuos alcanzado es muy reducido, (posiblemente porque deberían de estar en el suelo pupando) pero si podemos sacar en claro algunos matices.

El tratamiento 11H y TA presenta adultos colonizados por hongos, lo que nos indica su posible funcionalidad entomopatógena, para ello habría que hacer una investigación más en profundidad, dado que los datos no fueron significativos.

El tratamiento H1 presenta adultos sin colonizar.

El tratamiento del testigo, To, es 0, esto nos podría insinuar que todos los insectos se tiraron al sustrato a pupar o que por el contrario la metodología empleada no es la adecuada.

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Téllez–Jurado et al., 2009).

Es así por tanto, que dependiendo de nuestro aislado fúngico penetrará más o menos en nuestra plaga.

- Larvas:

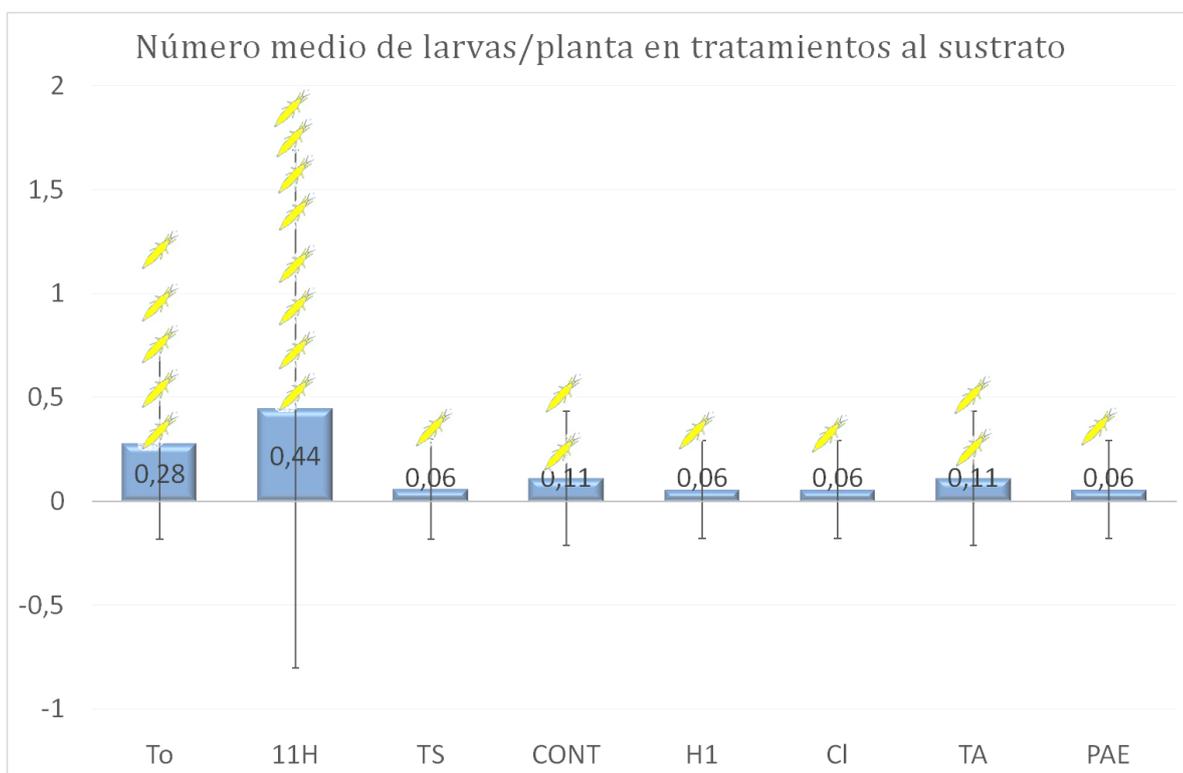


Gráfico 2. Número medio de larvas/planta en tratamientos al sustrato

La cantidad de larvas en el sustrato es mucho mayor en 11H y en el testigo, aun así, los datos no han sido más porque en ese momento no había población suficiente de trip, ya que deberían de estar en el sustrato pupando.

Si comparamos la cantidad de larvas presentes en 11H con el resto de los tratamientos, podríamos descartar a 11H como posible hongo entomopatógeno.

B. Segunda determinación posterior a la fase de prepupa y pupa una vez completados los grados día necesarios (264 grados día).

En este apartado no se obtuvieron valores de emergencia de adultos, lo cual es una rareza, dado que había población de trip durante todo el ensayo y bastante daño por trip en cotiledones. (Figura 34).

Lo que si se observó fueron moscas de la familia *Sciaridae* (Díptera).

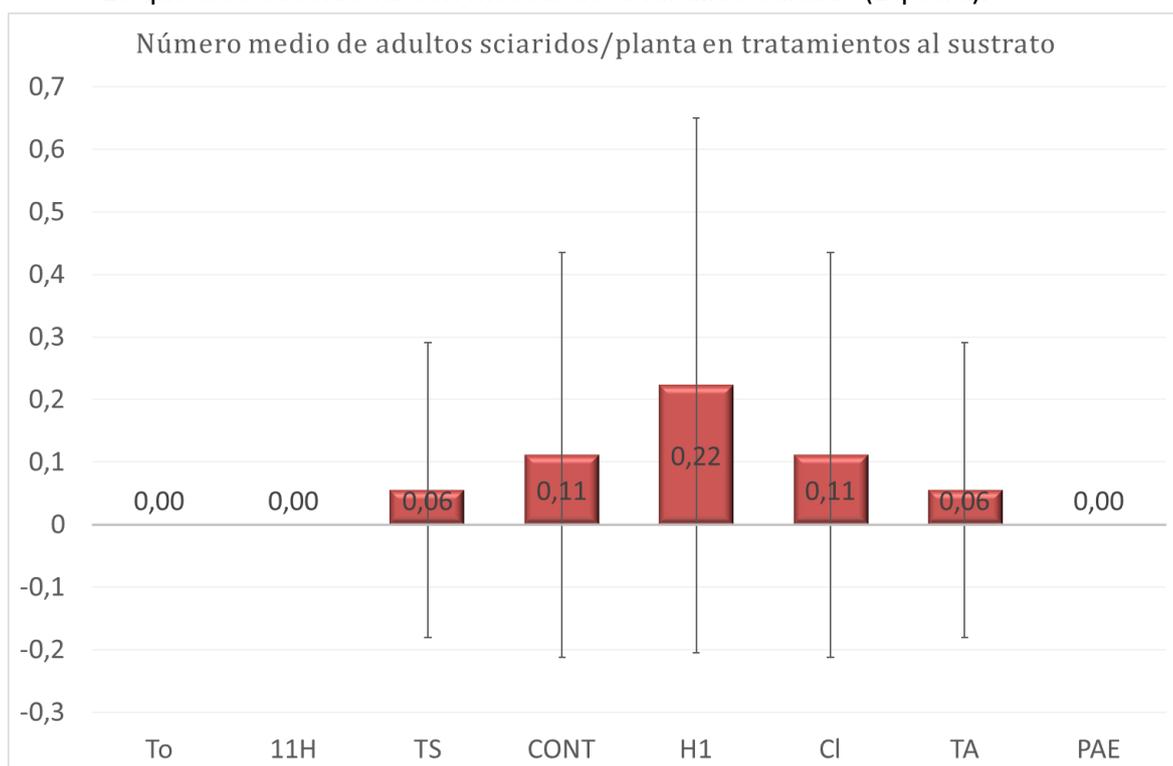


Gráfico 3. Número medio de adultos sciaridos/planta en tratamiento al sustrato.

H1 presentó la mayor presencia de adultos sciaridos/planta.

En los maceteros rojos con las placas cromotrópicas debería de haber habido una emergencia de *F. occidentalis* una vez pasados los grados día. No hubo presencia alguna

de trip, pero si se vieron dichas moscas, una de ellas colonizada por hongos, aunque no se determinó si procedían de nuestros aislados fúngicos.

He de recordar que los hongos entomopatógenos son muy específicos para las distintas plagas, de ahí que comercialmente y en campo sea muy compatible la lucha microbiológica con la biológica.

4.2. ENSAYO II: 8 tratamientos x 18 plantas de aplicación foliar 144 plantas

A. Primera determinación y conteo de larvas y adultos en cotiledones previos a las fases de prepupa y pupa.

- Adultos:

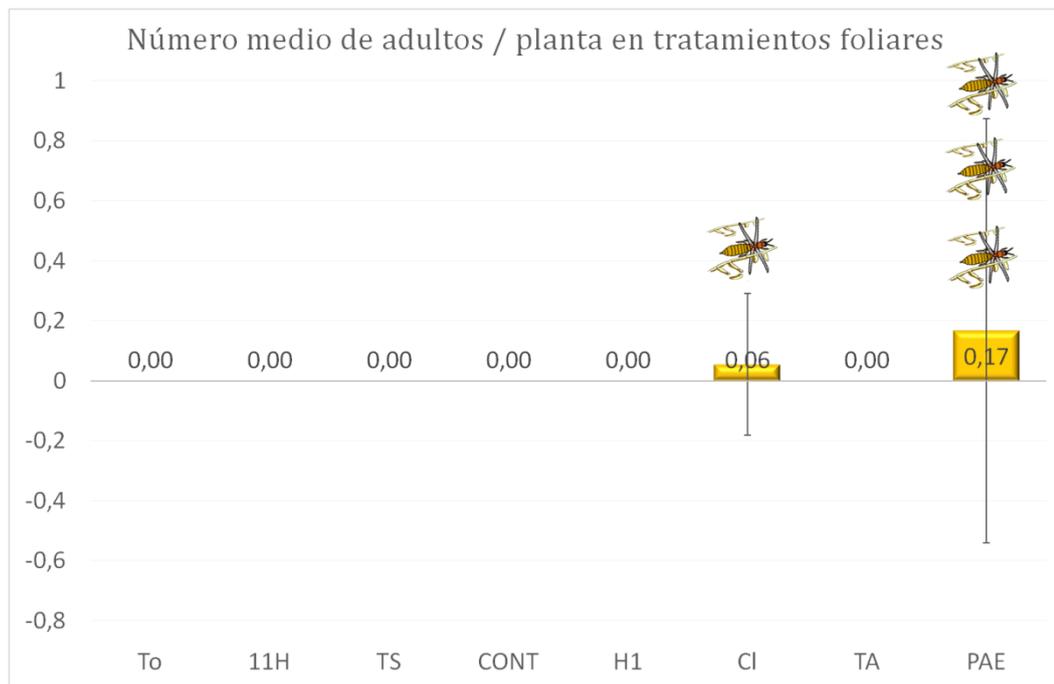


Gráfico 4. Número medio de adultos/planta en tratamientos foliares.

Nuevamente nos encontramos en la misma situación, poca población de *F. occidentalis* debido a dos suposiciones, la primera puede deberse a que todos los trips ya puparon y la segunda, que la metodología empleada no fue la adecuada.

En la aplicación foliar todos los adultos obtenidos fueron colonizados por hongos. Pero entre ellos con diferencias de cantidades de individuos sin resultados significativos al realizar la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal et al., 1952).

En un estudio realizado por Vestergaard todos los aislados de *M. anisopliae* causaron mortalidades superiores al 94% dentro de los 7 días posteriores a la inoculación. Por el contrario, los aislados de *V. lecanii* fueron de débil a moderadamente virulentos, causando 20-70% mortalidad. (Vestergaard et al., 1995).

Por tanto, es viable que algunos hongos generen mortalidades altas y otros fluctúen en el rango de moderadamente virulentos.

- Larvas:

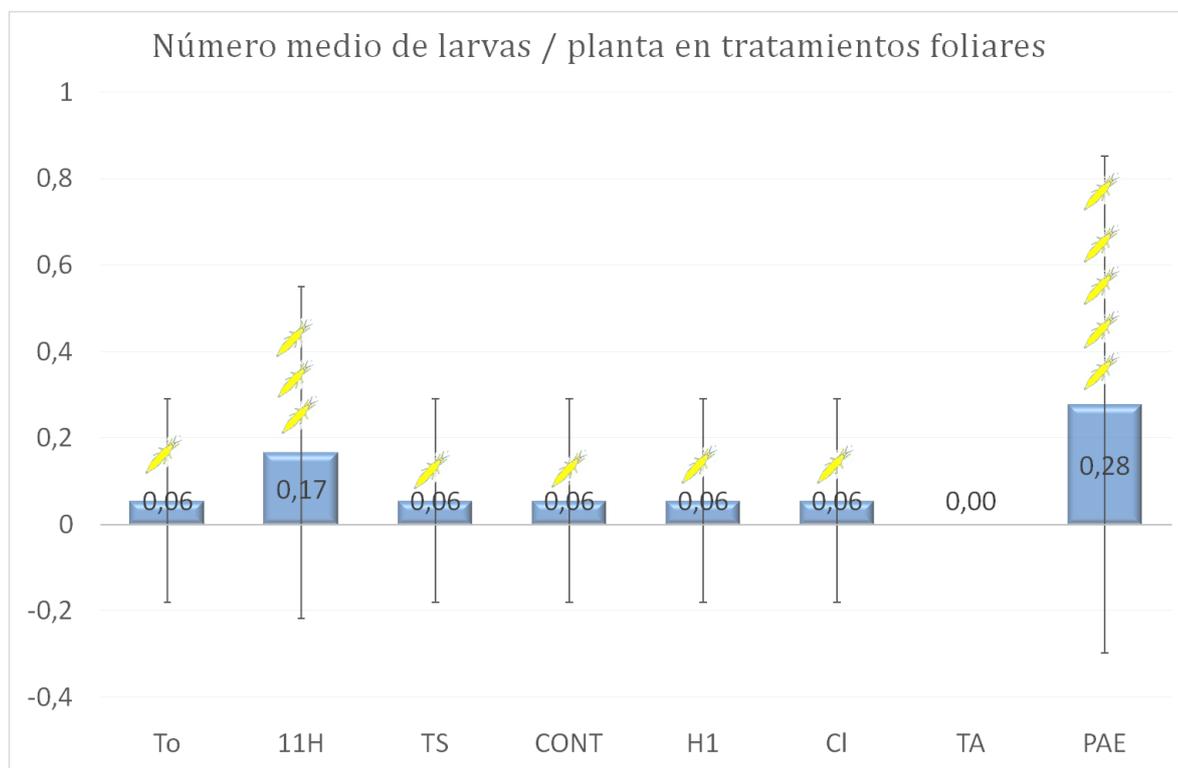


Gráfico 5. Número medio de larvas/planta en tratamientos foliares.

El tratamiento PAE fue el que mayor número medio de larvas/planta obtuvo, con respecto al resto de tratamientos, sin diferencias significativas.

B. Segunda determinación posterior a la fase de prepupa y pupa una vez completados los grados día necesarios (264 grados día).

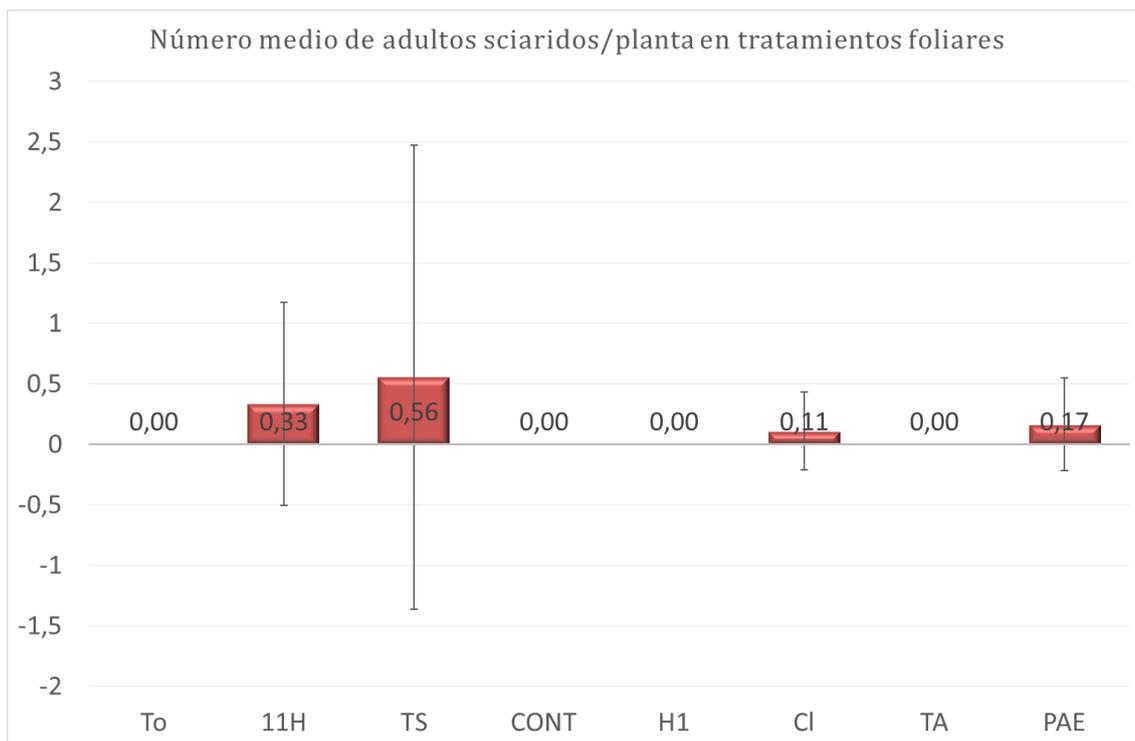


Gráfico 6. Número medio de adultos sciaridos/planta en tratamientos foliares.

En este apartado tampoco se obtuvieron valores de emergencia de adultos. Pero si obtuvimos moscas de la familia *Sciaridae* (Díptera).

En TS las moscas que se encontraron estaban colonizadas por hongos. Aunque no se determinó si procedían de nuestros aislados fúngicos.

F. occidentalis debería de haber emergido de la fase de pupa una vez pasados los grados día, pero no lo hizo y por tanto no hay resultados que analizar.

4.3. ENSAYO III: 8 tratamientos x 9 plantas de aplicación foliar 72 pantas y 144 cotiledones.

Se observó la presencia de estados larvarios y huevos sobre 18 cotiledones por tratamiento. Únicamente sobre las plantas tratadas vía foliar, cuando el número de grados día acumulados sea próximo a 202. Se examinó la presencia de larvas y huevos distribuidos homogéneamente por todo el ensayo, lo cual nos pudo garantizar una distribución homogénea de la plaga.

En este ensayo donde se analizaron en varias repeticiones los 7 tipos de hongos (de una de las colecciones del departamento de agronomía) tanto por vía foliar como en sustrato, se llegó a la conclusión que la metodología empleada no cerraba el ciclo de vida de *F. occidentalis*.

Los datos obtenidos son de adultos parasitados y cantidad de larvas previos al momento en el que *F. occidentalis* se lanza al suelo a la fase de prepupa y pupa no son relevantes. Por causas que desconocemos con dicha metodología no se obtuvieron valores de la segunda determinación.

Se obtuvieron datos de moscas de la familia *Sciaridae* (Díptera) (en los recipientes rojos con la placa cromotrópica) una vez pasados los grados-día necesarios para que *F. occidentalis* saliese de la fase de pupa que nunca llegó a completar.

Este ensayo novedoso en cuanto a experimentación, dado que hay poca metodología descrita anteriormente, sugiere varias hipótesis por las que el trip no terminó su ciclo de vida. Estas son algunas de las posibles hipótesis:

La opción de que la temperatura no fuese la adecuada no es viable ya que estuvo a una temperatura constante y nunca superó los límites que se describen en bibliografía.

La opción segunda es que, al vivir en cotiledón durante un tiempo, el insecto no se encontrase totalmente cómodo en plántulas tan pequeñas, donde no hay una gran cantidad lanosidad donde poder esconderse. Recordemos que los cotiledones, son hojas no diferenciadas y no poseen la cantidad "pelusa" que pueden tener las hojas diferenciadas. Al no tener esa "pelusa" puede que el mencionado insecto no llegase a terminar su ciclo biológico de forma adecuada.

La opción última opción es la del sustrato, puede que el sustrato o las condiciones de este no fuesen las adecuadas. Es posible que *F. occidentalis* no requiera de tanta humedad en el mismo. Altas humedades en los poros del sustrato podrían haber generado condiciones de encharcamiento.

En cuanto al comportamiento de algunos aislados fúngicos podemos decir que previos a la fase de pupa se encontraron trips adultos colonizados, es por tanto que la funcionalidad de los hongos podría ser viable en cuanto a control de esta determinada plaga.

Una vez que descubrimos que en nuestro ensayo no se terminaba el ciclo, se iba a proceder a un ensayo *in vivo* sobre plantas de berenjena de mayor porte en condiciones de invernadero. Las plantas fueron encargadas a un semillero para proceder a realizar un ensayo de macetas de mayor porte.

Por un lado, teníamos un número de plantas establecido en las cuales íbamos a tener la multiplicación de los trips (realizando una suelta de trips adultos para que se desarrollasen sobre la berenjena).

Una vez que estuviésemos próximos a los grados día donde el trip se lanza a pupar se colocarían las plantas de berenjena de la siguiente forma:

Las macetas eran cuadradas, se iba a colocar una en el centro (que es la que porta la planta) y otras macetas alrededor con sustrato solamente, de forma que cuando el trip cayese a pupar lo haría siempre sobre sustrato. Lo que haríamos sería inocular los aislados fúngicos en el sustrato. En lo que se refiere a aplicaciones en sustrato.

El tratamiento foliar se le aplicaría a la berenjena sobre las hojas en la que soltemos los trips.

Con el fin de ayudar al cierre del ciclo biológico del insecto se hubiese hecho en condiciones de iluminación natural y en una maceta donde el volumen sea mayor.

Pero la aplicación del decreto del Estado de Alarma se impuso a nuestras necesidades y nos ha sido imposible poderlo realizar.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS

5.1. Conclusión

De los resultados obtenidos en el presente proyecto no se puede extraer ninguna conclusión, debido a que con la metodología utilizada en el mismo no ha sido posible completar el ciclo biológico de *F. occidentalis*.

Aunque se evidenció durante el ensayo la presencia de daño abundante por puesta y picaduras de alimentación en los tejidos de hojas y cotiledones, así como la abundante presencia tanto de los adultos liberados, como de larvas L1 y L2 desarrolladas *in situ* durante la fase del ensayo en planta, la reducida población de estos estadios en la fase final y la total ausencia de adultos capturados tras las fases de prepupa y pupa en todos los tratamientos (incluido el testigo) no permiten concluir nada sobre el posible efecto entomopatógeno de los aislados estudiados.

5.2. Recomendaciones

Para un mayor análisis realizaría un ensayo *in vivo* sobre plantas de mayor porte, con el fin de determinar si alguno de los aislados fúngicos es viable para la lucha microbiológica contra una de las plagas que más afectan a nuestra agricultura.

Con tal cantidad de hongos que la naturaleza posee, que pueden combatir y ayudarnos a prosperar en un mundo donde los plaguicidas perjudican nuestra salud, es de nuestra responsabilidad como científicos prosperar en la investigación que este ámbito nos abre.

Bien es cierto, que no todos los hongos serán eficientes en cuanto a nivel comercial, pero no necesitamos todos los hongos para combatir en esta lucha, sino solo los necesarios para poder avanzar en un mundo donde nuestros suelos sean más fértiles, nuestras aguas más puras y nuestra salud más sólida.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agriculturers. Red de especialistas en agricultura. (2014) Recuperado de <http://agriculturers.com/manejo-y-control-de-frankliniella-occidentalis-el-trips-de-las-flores/>
- Amiri, B., Ibrahim, L. y Butt, T. M. (1999). Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology*, 9(4), 487-498.
- Asaff Torres, A., Reyes Vidal, Y., López y López, V.E. y de la Torre, M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, 21, 291-295.
- Barnes, S. E. y Moore, D. (1997). The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological research*, 101(6), 662-666.
- Buechel, T. (2020). Bichos en el sustrato: Los trips. Recuperado el 13 May 2020, de <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/bichos-en-el-sustrato-los-trips/>
- Castillo, C., Cañizales, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R. y Morillo, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo-Venezuela. *Academia*, XI(23), 275-281.
- Cheah, C., Reardon, R. C. y Onken, B. (2004). *Biological control of hemlock woolly adelgid*. Forest Health Technology Enterprise Team, USDA Forest Service. Recuperado de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Z2EoBhAzpDIC&oi=fnd&pg=PP5&dq=BIOLOGICAL+CONTROL+OF+HEMLOCK+WOLLY+ADELGID&ots=HBg2sl80dQ&sig=m3PhKfuLs-ecnEtI5VUX1swfy3Q#v=onepage&q=BIOLOGICAL%20CONTROL%20OF%20HEMLOCK%20WOLLY%20ADELGID&f=false>
- Control Bío. (s.f.). Volviendo a la naturaleza. Recuperado de <https://controlbio.es/es/407-paecilomyces-fumosoroseus>

- De Bach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall, London, UK.
- Deshpande, M. V. (1999). Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical reviews in microbiology*, 25(3), 229-243.
- EcuRed. (s.f.). *Metarhizium anisopliae*. Recuperado de https://www.ecured.cu/Metarhizium_anisopliae
- Escudero, A. L. (1998). *Estructura y dinámica de las comunidades de ácaros del ecosistema hortícola mediterráneo: bases para el empleo de fitoseidos en el control biológico de las arañas rojas* (Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia.
- Fisher, R. (1925). *Statistical Methods For Research Workers*, Cosmo study guides.
- Gandarilla Pacheco, F.L. (2012). *Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)* (Doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Gillespie, A. T. y Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*, 27(2), 203-215.
- Gómez Moya, C. (2007). *Dinámica del sistema depredador-presa de las arañas rojas y los fitoseidos (Acari: Tetranychidae, Phytoseidae) en cultivos hortícolas* (Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/15228/tesisUPV2635.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hajek, A. E. (1997). Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In *Advances in microbial ecology* (pp. 193-249). Springer, Boston, MA.
- Hegedus, D.D. y Khachatourians, G.G. (1995). The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology advances*, 13(3), 455-490.
- Indiamart. (s.f.). *Insecticides and Pesticides*. Recuperado de <https://www.indiamart.com/proddetail/beauveria-bassiana-biopesticides-20744544812.html>

- Informaciones agronomicas. (s.f.). Hongos entomopatógenos: Origen, ventajas, familia. Recuperado de <https://agronoticias2012.blogspot.com/2017/07/hongos-entomopatogenos-origen-ventajas.html>
- Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. (s.f.). Gestión Integrada de Plagas y Enfermedades. Recuperado de <http://gipcitricos.ivia.es/metodos-de-control-20.html/foto-11-4>
- James, R. R., Buckner, J.S. y Freeman, T.P. (2003). Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 67-74.
- Jeffs, L. B., Xavier, I. J., Matai, R. E., y Khachatourians, G. G. (1997). Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the general *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(11), 936-948.
- Jegorov, A., Sedmera, P., Mařha, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Landa, Z. y Eyal, J. (1994). Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, 37(5), 1301-1303.
- Jiménez Pérez, I. (2015). *Estudio de las especies de pulgones y sus enemigos naturales en una finca de horticultura ecológica en Alcàsser, Valencia* (Trabajo final de carrera). Universidad Politécnica de Valencia.
- Kershaw, M. J. y Talbot, N. J. (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 23(1), 18-33.
- Khachatourians, G.G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *Human and animal relationships* (pp. 331-364). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koppert Biological Systems. (s.f.). *Trips occidental de las flores*. Recuperado el 18 May 2020, de <https://www.koppert.es/retos/trips/trips-occidental-de-las-flores/>
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.

- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A. y Chelkowski, J. (1998). Beauvericin Production by *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(8), 3084-3088.
- Mendoza, J.G. y Toledo, J.J. (2019). *El uso de agentes biológicos para el control de Frankliniella occidentalis (Pergande) en el cultivo de pepino (Cucumis sativus L.)* (Licenciatura). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (s.f.) Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-ecologica/>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, 63, 95-103.
- Moreno Vicente, I. (2018). *Resistencia a nuevos insecticidas en moscas blancas de cultivos hortícolas* (Doctorado). Universidad de Cartagena.
- Planeta semilla. (s.f.). Pepinillo de encurtir wisconsin smr 58. Recuperado de <https://planetasemilla.es/pepinos/464-pepinillo-de-encurtir-wisconsin-smr-58.html>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., y De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31, 856-860.
- Rubio, V. y Fereres, A. (2005). *Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos* (pp. 215-229). Madrid. Recuperado de <https://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres%2c%202005.pdf>
- Solagro. (s.f.). Soluciones Agrosostenibles. Recuperado de <https://solagro.com.pe/blog/que-y-como-se-desarrolla-el-hongo-beauveria-bassiana/>
- Téllez–Jurado, A., Cruz Ramírez, M., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., y Arana–Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana De Micología*, 30, 73-80.
- Téllez–Jurado, A., Cruz Ramírez, M., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., y Arana–Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos

entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana De Micología*, 30, 73-80.
Recuperado de
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007

- Van Lenteren, J.C. (2003). *Quality control and production of biological control agents. Theory and testing procedures*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Vargas Tenorio, D. (2017). *Efecto de la aplicación de *Lecanicillium lecanii* sobre la incidencia y severidad de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica*)* (Licenciatura). Universidad de Costa Rica.
- Vestergaard, S., Gillespie, A. T., Butt, T. M., Schreiter, G., y Eilenberg, J. (1995). Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2), 185-192.
- Wessels, J. G. (1999). Fungi in their own right. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 134-145.
- Wraight, S., Ugine, T., Ramos, M. y Sanderson, J. (2016). Efficacy of spray applications of entomopathogenic fungi against western flower thrips infesting greenhouse impatiens under variable moisture conditions. *Biological Control*, (97), 31-47.
- Xie, T., Jiang, L., Li, J., Hong, B., Wang, X. y Jia, Y. (2019). Effects of *Lecanicillium lecanii* strain JMC-01 on the physiology, biochemistry, and mortality of *Bemisia tabaci* Q-biotype nymphs. *PeerJ*, (7), e7690.

Cultivating horticultural crops since its inception has been facing different pest insects. Developments at the level of integrated production and organic raise the need for new pathways to be more respectful with the environment and to limit the abuse of phytosanitary.

Entomopathogenic fungi have great potential as control agents, since they constitute a group with more than 750 species that disperse in the environment cause fungal infections in the insect populations. These organisms begin their process infective when the spores are retained on the surface of the tegument.

The genres most important are: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoopthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* and *Verticillium*. The development of biological control and microbiological is an agricultural practice that is constantly growing, seeking to control populations below minimum thresholds of damage, by the use mainly of natural enemies (insects or mites) and microbial agents of biological control.

The used species of microorganisms are determined by the biological cycle of the insect. In the case of *Frankliniella occidentalis* in their larval state, and adults are found in the aerial part of the plant, and its member states, of prepupa and pupa, on the floor; this allows us to use entomopathogenic fungi, both via the leaf, such as soil.

Among the abiotic factors that affect the viability and persistence of entomopathogenic fungi in the field are the temperature and the relative humidity. *Frankliniella occidentalis* is a transmitter of virus as polyphagous borers such as TSWV, hence the importance of finding new tools to control microbiological complementary or alternative to the control with natural enemies, especially in certain crops like tomato where some natural enemies are not installed properly.