

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE HONGOS PRESENTES EN LA
COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL
CAUCA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE TRIPS EN CRISANTEMO
(*Chrysanthemum sp*)**



Universidad
del Cauca

JOHAN SEBASTIÁN CHÁVEZ MOSQUERA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2022**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE HONGOS PRESENTES EN LA
COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL
CAUCA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE TRIPS EN CRISANTEMO
(*Chrysanthemum sp*)**

JOHAN SEBASTIÁN CHÁVEZ MOSQUERA

**Proyecto de grado en la modalidad de investigación presentado como
parte de los requisitos para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial**

DIRECTORES

**JOSE LUIS HOYOS CONCHA, Ph.D
IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2022**

Nota de aceptación

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo autor y lo encuentran satisfactorio

JOSE LUIS HOYOS CONCHA, Ph.D

Director

IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ M.Sc.

Director

CLARA INES GIRALDO ARISTIZABAL

Presidente del Jurado

RAUL ALBERTO CUERVO MULET

Jurado

Popayán _05_ de _Mayo_ de _2022_

DEDICATORIA

Dedico este trabajo que es en gran parte a mi familia, mi padre Gerardo y mi madre Ana, por su amor y apoyo, a mis hermanitas Camila y Natalia, a mi hermano Carlos. Mi sobrino y sobrina, Carlos y Mariana. A Oscar. Y especialmente a mis abuelos, Absalón y Licenia, a todos ellos por motivarme a seguir. A Marcela por su apoyo incondicional. Y a cada persona que me ayudó y apoyó durante este proceso.

“Lost in the dream – The war on drugs”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de trabajo de grado Iván Darío Otero, por su gran ayuda, conocimiento, paciencia y dedicación para llevar a cabo el desarrollo de la investigación.

Al profesor José Luis Hoyos por su tiempo dedicado y los conocimientos brindados en asesorías en el trabajo.

A Isabela Paz Fernández por iniciar este camino y desearle muchos éxitos.

A Juan David Galindo y familia Velasco por su disposición en el cultivo de flores y recomendaciones recibidas. Bendiciones.

A las personas del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca quienes me brindaron orientaciones y recomendaciones durante el trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO REFERENCIAL	17
1.1 LOCALIZACIÓN	17
1.2 MARCO TEORICO	17
1.2.1 Generalidades Crisantemo	17
1.2.1.1 Clasificación Comercial Crisantemos	18
1.2.1.2 Manejo Cultivo.	19
1.2.1.2.1 Plantas Madres	20
1.2.1.2.2 Esquejes.	20
1.2.1.2.3 Cultivo.	20
1.2.1.3 Importancia Económica.	20
1.2.1.4 Principales Plagas del Cultivo de Flores.	21
1.2.2 Generalidades Orden Thysanoptera	22
1.2.2.1 Descripción y Ciclo de Vida.	22
1.2.2.2 Afectación de Trips en Cultivos	23
1.2.2.3 Manejo del Trips.	24
1.2.2.3.1 Control Químico de Trips.	24
1.2.2.3.2 Prácticas Culturales	25
1.2.2.3.3 Control Biológico de Trips.	25
1.2.3 Hongos entomopatógenos	26
1.2.3.1 Modos de Infección Hongos Entomopatógenos.	26
1.3 MARCO HISTORICO	29
2. METODOLOGÍA	32
2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS PRESENTES EN LA COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA FRENTE A DIFERENTES ESTADIOS DE TRIPS COMO PLAGA DEL CULTIVO DE FLORES, BAJO CONDICIONES <i>In vitro</i>	32

2.1.1 Obtención de Trips	32
2.1.2 Crianza de Trips	33
2.1.3 Obtención de Hongos	34
2.1.4 Activación de los Hongos	35
2.1.4.1 Identificación Taxonómica de Hongos.	35
2.1.5 Pruebas de Patogenicidad Bajo Condiciones de Laboratorio	35
2.1.5.1 Diseño Experimental.	35
2.1.5.2 Preparación de la Solución de Hongos	35
2.1.5.3 Bioensayos en Laboratorio.	36
2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS HONGOS SELECCIONADOS PARA EL CONTROL DE TRIPS MEDIANTE CONDICIONES DE INVERNADERO	37
2.2.1 Manejo de Plantas de Crisantemo en Invernadero	38
2.2.1.1 Adecuación de Invernadero.	38
2.2.1.2 Obtención de Esquejes.	39
2.2.1.3 Trasplante y Manejo de las Plantas.	39
2.2.2 Pruebas de Patogenicidad en Invernadero	40
2.2.2.1 Preparación de los Hongos.	40
2.2.2.2 Prueba de Fitotoxicidad.	40
2.2.2.3 Desarrollo Experimental en Invernadero.	41
2.2.2.4 Infestación de Trips.	42
2.2.2.5 Diseño Experimental.	43
2.2.2.7 Evaluación en Actividad Biocontroladora.	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS PRESENTES EN LA COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA FRENTE A DIFERENTES ESTADIOS DE TRIPS COMO PLAGA DEL CULTIVO DE FLORES, BAJO CONDICIONES <i>In vitro</i>	46
3.1.1 Obtención de Trips	46
3.1.2 Crianza de Trips	47
3.1.3 Identificación Taxonómica de Hongos	50
3.1.4 Pruebas de Patogenicidad	55

3.1.4.1 Bioensayo 1 Larvas de Segundo Instar	55
3.1.4.1.1 Evaluación de Mortalidad en Larvas de Segundo Instar.	55
3.1.4.1.2 Evaluación de Tiempo Letal en Larvas de Segundo Instar.	60
3.1.4.2 Bioensayo 2 Trips Adultos	61
3.1.4.2.1 Evaluación de Mortalidad en Trips Adultos.	61
3.1.4.2.2 Evaluación de Tiempo Letal en Trips Adultos.	65
3.1.4.3 Bioensayo 3 Evaluación de Mortalidad en Pupas	67
3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS HONGOS SELECCIONADOS PARA EL CONTROL DE TRIPS MEDIANTE CONDICIONES DE INVERNADERO	72
3.2.1 Ensayo de Fitotoxicidad	72
3.2.2 Evaluación de la Capacidad Biocontroladora	73
3.2.2.1 Conteo de Trips en Condiciones de Invernadero.	73
3.2.2.2 Determinación de la Calidad de Plantas.	76
4. CONCLUSIONES	80
5. RECOMENDACIONES	81
6. BIBLIOGRAFIA	82

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica crisantemo.	18
Cuadro 2. Clasificación flores según la forma.	18
Cuadro 3. Plagas de interés comercial en cultivos ornamentales.	21
Cuadro 4. Clasificación taxonómica especies de Trips en cultivos ornamentales	22
Cuadro 5. Diseño experimental ensayo en laboratorio	35

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación geográfica área de estudio.	17
Figura 2. Ciclo de vida Trips <i>Frankliniella occidentalis</i>	23
Figura 3. Proceso de infección de <i>Beauveria bassiana</i>	28
Figura 4. Recolección de Trips.	33
Figura 5. Crianza de Trips en laboratorio.	35
Figura 6. Montaje de invernadero ubicado en Piendamó, Cauca.	38
Figura 7. Manejo de plantas de crisantemo	39
Figura 8. Jaulas unidades experimentales	42
Figura 9. Infestación de Trips en unidades experimentales	42
Figura 10. Obtención de Trips de un cultivo afectado.	47
Figura 11. Sistema de crianza de Trips en laboratorio.	47
Figura 12. Estadios de Trips obtenidos en laboratorio.	49
Figura 13. Registro cámara húmeda larvas de Trips muertas: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol.	58
Figura 14. Registro cámara húmeda adultos de Trips muertos: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol.	63
Figura 15. Registro cámara húmeda de pupas de Trips muertas: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol registro infección hongo.	69
Figura 16. Flores de crisantemo amarillo y blanco sin daño en el ensayo de fitotoxicidad.	73

Figura 17. Conteo promedio de Trips con ayuda de cintas adhesiva en experimentos enjaulados (T1: Biológico silvestre *Penicillium sp.* 321, T2: Biológico comercial *Beauveria bassiana*, T3: Químico insecticida CAZADOR® y T4: Control plantas con infestación de Trips). 74

Figura 18. Cinta adhesiva blanca para el registro de Trips. 74

Figura 19. Calificación estimada de la calidad de las plantas para cada tratamiento (T1: Biológico silvestre *Penicillium sp.* 321, T2: Biológico comercial *Beauveria bassiana*, T3: Químico insecticida CAZADOR®, T4: Control plantas con infestación de Trips, T5: Control: Plantas con aplicación de biológico silvestre *Penicillium sp.* 321 y T6: Control: plantas sin aplicación productos biológicos y químicos y sin infestación con Trips). 77

Figura 20. Registro fotográfico calidad de las flores para cada tratamiento al final del ensayo 78

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variables de evaluación nivel daño plantas: follajes y flores.	40
Tabla 2. Descripción tratamientos	43
Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas del género <i>Penicillium sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i>	50
Tabla 4. Identificación taxonómica de hongos.	52
Tabla 5. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de larvas de segundo instar de Trips causado por cepas de <i>Penicillium sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i> 7 días después de la inoculación	55
Tabla 6. Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra larvas de segundo instar Trips.	56
Tabla 7. Larvas de segundo instar muertas en cámara húmeda.	59
Tabla 8. Valores de TL ₅₀ en larvas de segundo instar Trips.	60
Tabla 9. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de adultos Trips causado por cepas de <i>Penicillium sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i> 9 días después de la inoculación.	61
Tabla 10 Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra adultos de Trips.	62
Tabla 11. Adultos de Trips muertos en cámara húmeda.	64
Tabla 12. Valores de TL ₅₀ en adultos de Trips.	65
Tabla 13. Valores de TL ₅₀ referenciados usando hongos entomopatógenos adultos de Trips.	66
Tabla 14. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de Pupas de Trips causado por cepas de <i>Penicillium sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i> 9 días después de la inoculación.	67
Tabla 15. Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra pupas de Trips.	68

RESUMEN

En el departamento del Cauca la floricultura se concentra en los municipios de Cajibío, Piendamó y Silvia beneficiando a alrededor de 100 productores de crisantemo. El cultivo de flores es afectado por diversas plagas entre las que se destacan los Trips, insectos picador-chupador de tamaño diminuto (1-2mm), con altas tasas de reproducción y carácter polífago, la infestación de esta plaga está asociada a deformación de flores y hojas, existiendo una necesidad de buscar alternativas de control de Trips en ornamentales. La presente investigación se realizó con el fin de evaluar el potencial entomopatógeno de 7 cepas de *Penicillium sp.* (*Penicillium sp.* 321, *Penicillium sp.* 313, *Penicillium sp.* 121 y *Penicillium sp.* 129) y *Trichoderma sp.* (*Trichoderma sp.* 311, *Trichoderma sp.* 323 y *Trichoderma sp.* 25) contra larvas de segundo instar, adultos y pupas bajo condiciones de laboratorio y también se evaluó su actividad biocontroladora en experimentos controlados con plantas de crisantemo en condiciones de invernadero. La cepa *Penicillium sp.* 321 registró mayores valores de mortalidad en larvas ($66,66 \pm 7,22\%$) y adultos ($76,67 \pm 5,77\%$) a la concentración de 2.6×10^6 conidios/mL y mostró mayores signos de micosis sobre individuos muertos que las otras cepas. En experimentos controlados bajo condiciones de invernadero se ajustó el inóculo a 5×10^7 conidios/mL y aunque no mostró buenos resultados en la actividad biocontroladora con similares resultados que el tratamiento control con plantas infestadas de Trips en la evaluación de calidad, el 20% de las plantas de crisantemo presentaban aun valor comercial, sugiriendo que la cepa *Penicillium sp.* 321 puede influir en reducir el nivel de daño del Trips. Este estudio permite resaltar la importancia de evaluar el potencial entomopatógeno de nuevas cepas contra los Trips de las flores.

Palabras clave: Hongo entomopatógeno, Trips, crisantemo, ornamentales, actividad biocontroladora.

ABSTRACT

In the Department of Cauca, floriculture is concentrated in the municipalities of Cajibío, Piendamó and Silvia, benefiting about 100 chrysanthemum growers. The cultivation of flowers is affected by various pests, among which are Trips, tiny (1-2 mm) stinging and sucking insects, with high reproduction rates and polyphagous character, the infestation of this pest is associated with deformation of flowers and leaves, and there is a need to seek alternatives for the control of Trips in ornamentals. The present investigation was carried out to evaluate the entomopathogenic potential of 7 strains of *Penicillium* sp. (*Penicillium* sp. 321, *Penicillium* sp. 313, *Penicillium* sp. 121 and *Penicillium* sp. 129) and *Trichoderma* sp. (*Trichoderma* sp. 311, *Trichoderma* sp. 323 and *Trichoderma* sp. 25) against second instar larvae, adults and pupae under laboratory conditions and their biocontrol activity was also evaluated in controlled experiments with chrysanthemum plants under greenhouse conditions. The *Penicillium* sp. 321 strain recorded higher mortality values on larvae ($66.66 \pm 7.22\%$) and adults ($76.67 \pm 5.77\%$) at the concentration of 2.6×10^6 conidia/mL and showed greater signs of mycosis on dead individuals than the other strains. In controlled experiments under greenhouse conditions, the inoculum was adjusted to 5×10^7 conidia/mL and although it did not show good results in biocontrol activity with similar results to the control treatment with Trips-infested plants in the quality evaluation, 20% of the chrysanthemum plants still presented commercial value, suggesting that the *Penicillium* sp. 321 strain can influence in reducing the level of Trips damage. This study highlights the importance of evaluating the entomopathogenic potential of new strains against flower thrips.

Key words: Entomopathogenic fungus, thrips, chrysanthemum, ornamentals, biocontrol activity.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la floricultura es una de las actividades agrícolas más importantes junto al cultivo del café y banano, genera las mayores divisas, representando el segundo renglón de exportaciones agrícolas del país (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2020), además de tener un alto impacto social en el sector rural por la creación de aproximadamente 140.000 empleos directos, especialmente madres cabezas de familia (Colombia Trade, 2019). Colombia ocupa el segundo lugar entre países exportadores de flores a nivel mundial, después de Holanda, con una gran oferta y calidad de flores, siendo el primer exportador de claveles, el cuarto en rosas y lirios y el segundo en crisantemos y el primer proveedor al mercado de Estados Unidos, donde en 2021 se registró la mayor cifra en exportaciones de flores con US\$1.727 millones, un aumento del 22,4 % con relación al 2020 (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2020; El Espectador, 2022). En el departamento del Cauca, en los municipios de Cajibío, Piendamó y Silvia, la floricultura, especialmente el cultivo de crisantemo, es una de las principales actividades agrícolas de la región. Este cultivo involucra cerca de 100 pequeños productores en toda la región que se dedican a esta actividad como su única fuente de ingresos (Luis Carlos, comunicación personal, 2018).

El cultivo de flores es afectado por numerosas plagas como la araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) áfidos o pulgones (*Alphis spp.*, *Myzus spp.*) y el Trips (*Frankliniella spp.*) (Torres & Rios, 2007; Valcarcel-Calderon, 2013). Donde se destacan los Trips, pequeños insectos picadores-chupadores, de pequeño tamaño (Hembras 1,4 mm y machos 1 mm) y delgados que se alimentan de tejidos internos y suculentos como flores, follaje o polen, la infestación por esta plaga está asociada a la defoliación, aborto de flores y deformación de hojas, incidiendo en una merma de la calidad de las flores (Loera-alvarado et al., 2017), es de resaltar que esta es una plaga de considerable importancia por tener ciclos de vida muy cortos y alta fecundidad (Bustillo, 2009). Algunos autores consideran al Trips una de las principales plagas de los cultivos ornamentales (Arévalo, Quintero, & Guillermo, 2003; Jessica M Kivett, Cloyd, & Bello, 2015; Loera-alvarado et al., 2017) y que uno de los principales cultivos con mayor abundancia de Trips es el crisantemo, siendo este cultivo el principal en la floricultura del departamento del Cauca. Generalmente para su control, los productores aplican diferentes pesticidas, sin manejo técnico de la dosificación y sin protección personal, lo que conlleva a generación de resistencia al pesticida

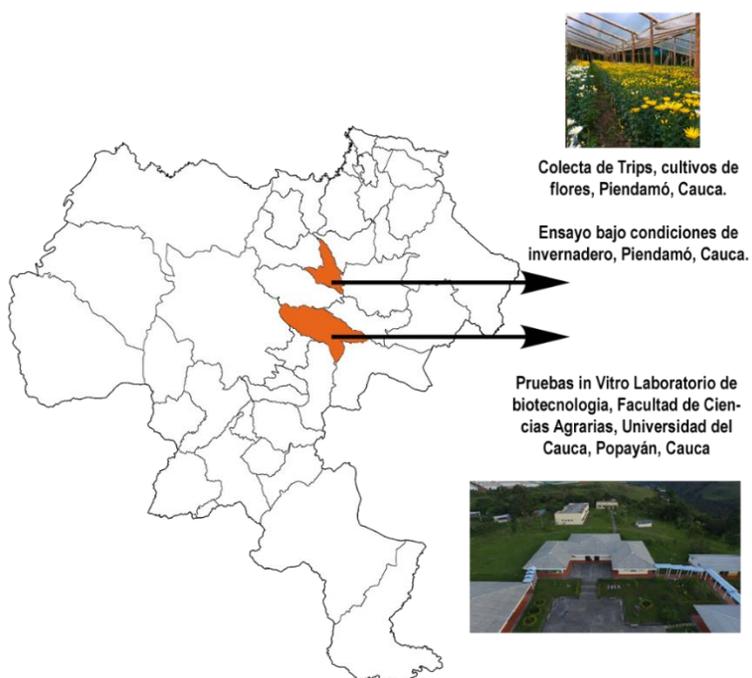
por parte del insecto, afectación al medio ambiente y a la salud de los trabajadores y comunidades de alrededor de los cultivos. Actualmente, existe una tendencia en el mercado internacional por "flores limpias" que garanticen la conservación del medio ambiente y la protección de la salud de los floricultores, teniendo en cuenta que el 95% de la producción nacional de flores va hacia la exportación (Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales, 2020), un sector con enfoque en el mercado internacional estricto en cuanto a calidad fitosanitaria, por tal razón existe la necesidad de obtener productos biológicos con potencial para el control de Trips en la región productora de flores en el departamento del Cauca. El uso de hongos entomopatógenos es una de las técnicas más eficaces en el control biológico por su especificidad en control de plagas, y la relativa sencillez de su producción, se caracterizan por infectar todas las etapas de la vida de los insectos y tienen diferentes formas de acción evitando que el insecto pueda desarrollar resistencia (Albuquerque & Albuquerque, 2009). La presente investigación se realizó con el fin de evaluar el potencial entomopatógeno de diferentes hongos presentes en el cepario del grupo ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca con potencial como agentes de control biológico contra el Trips de las flores, donde se pretende determinar y evaluar la actividad antagónica de cepas de hongos frente a diferentes estadios de Trips como plaga del cultivo de crisantemo, bajo condiciones *In vitro* y la actividad biocontroladora de los hongos seleccionados para el control de Trips mediante ensayos *In vivo* como estudio preliminar en invernadero.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 LOCALIZACIÓN

La investigación fue dividida en dos fases: se realizaron ensayos bajo condiciones de *In vitro* en el laboratorio de biotecnología la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca y un ensayo en condiciones de invernadero en una finca productora de flores de crisantemo en el municipio de Piendamó. Para la colecta de muestras se realizaron en dos fincas productoras de flores en el municipio de Piendamó, Cauca como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Ubicación geográfica área de estudio.



Fuente: Elaboración propia.

1.2 MARCO TEORICO

1.2.1 Generalidades Crisantemo

El crisantemo (*Chrysanthemum sp.*) es originario de China y Japón y actualmente existen muchas variedades alrededor del mundo, superando las 2000 variedades

(Hena Camacho, 2019; Rodriguez, 1998) producto de cruzas y selección de varias especies. Es un cultivo ornamental de la familia de las Asteráceas, de gran importancia económica en flores de corte en Colombia, con diferentes variedades, colores y flores que presentan muchas formas (margaritas, anémonas, tubulares y pompones) (Red Agrícola, 2020).

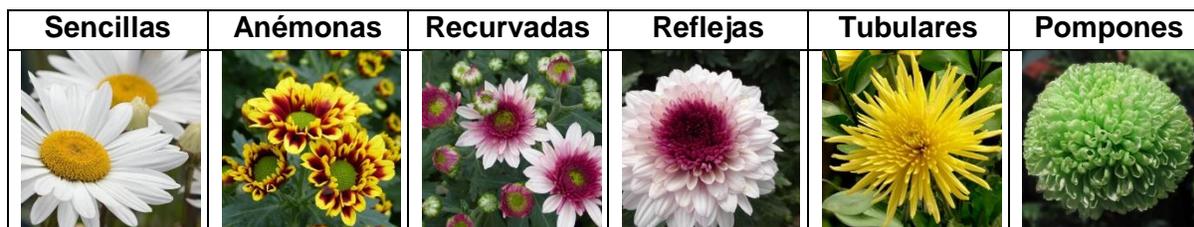
Cuadro 1. Clasificación taxonómica crisantemo

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliophyta
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Chrysanthemum L.</i>

Fuente: Sanabria Nuñez (2019).

1.2.1.1 Clasificación Comercial Crisantemos. El crisantemo es una planta perenne, con hojas verdes claras a oscuras y bordes ondulados o dentadas, rugosas; presenta inflorescencia en capitulo, en racimos o abierta, con diversos tipos de capítulos que permiten clasificarlos comercialmente según su forma, como se observa en el cuadro 2, tipo sencillas o margaritas, anémonas, recurvadas, reflejas, tubulares, pompones (Infoagro; Sanabria Nuñez, 2019).

Cuadro 2. Clasificación flores según la forma.



Una o dos hileras de flores pistiladas (pétalos).	Similar a las sencillas, pero con flores concéntricas tubulares y alargadas. De un solo color o diferentes.	Presenta una forma globular, con flores radiales y curvadas hacia adentro.	Forma redondeada, con flores radiales doblándose hacia afuera y hacia abajo.	Presentan flores radiales curvas y tubulares.	Presenta una forma globular, con flores radiales cortas y uniformes. No presenta flores concéntrica.
---	---	--	--	---	--

Fuente: Sanabria Nuñez (2019).

Dentro de las empresas del sector floricultor, los crisantemos también se clasifican de acuerdo al tipo de floración que presentan, es decir por el número de flores que existan por tallo: tipo Estándar, una inflorescencia por tallo o tipo Spray, varias inflorescencias por tallo (Henao Camacho, 2019).

1.2.1.2 Manejo Cultivo. Los factores ambientales que influyen en mayor medida en el crecimiento y la floración son la luz, la temperatura y la humedad. La tasa de crecimiento vegetativo y la floración también se ven afectadas por la temperatura, el rango óptimo varía en función de cada variedad, oscilando entre 15-25°C, los cambios bruscos de temperatura provocan malformaciones (Henao Camacho, 2019). El cultivo requiere de una humedad relativa entre 60-70%, a valores altos de humedad se propicia la formación de enfermedades como la Roya (Henao Camacho, 2019; Infoagro).

El crisantemo es una planta de día corto que en condiciones naturales florece en 8 a 9 semanas para comercialización (Henao Camacho, 2019). Bajo condiciones de invernadero se realizan acciones para alterar el fotoperiodo de las plantas como es el uso de lámparas LED, fluorescentes o incandescentes como fuentes de luz artificial para evitar la inducción de floración temprana y que la planta alcance un tamaño óptimo antes de florecer (Henao Camacho, 2019; Infoagro).

Los crisantemos se propagan vegetativamente a través de retoños, esquejes o por micro propagación (Henao Camacho, 2019). Para obtener por esquejes se requiere contar con plantas para obtenerlos, a las que se denomina plantas madres (Sanabria Nuñez, 2019).

1.2.1.2.1 Plantas Madres. Una planta madre es un arbusto destinado a la producción de esquejes (Edwin & Giraldo, 2017), estas requieren 4 horas de luz artificial durante la noche (ciclos de luz nocturnos) para mantenerlas en estado vegetativo. Son reemplazadas cada 5 o 6 producciones de esquejes por plantas nuevas (Gonzales & Flores, 2010).

1.2.1.2.2 Esquejes. De las plantas madres se obtienen esquejes de 12-15 cm de altura o entre 4-5 cm de ancho, los cuales se colocan en bandejas de multiplicación o bancos, para favorecer el enraizamiento, donde se usan diferentes sustratos como arena, aserrín o compost y también se hace uso de hormonas estimuladoras de enraizamiento (Edwin & Giraldo, 2017). Se usa luz como apoyo para evitar la formación de botones florares. El enraizamiento de cada esqueje ocurre entre 2 a 4 semanas con ayuda de nebulización (riego por aspersión), retirados cuando las raíces miden 1 cm, listas para sembrar (Gonzales & Flores, 2010).

1.2.1.2.3 Cultivo. La siembra de esquejes enraizados se hace de acuerdo al tipo de variedad a sembrar, se realiza en camas de sustrato, tierra-compost, previamente preparados con mejoradores y fertilizantes para evitar generación de patógenos (Hena Camacho, 2019). Plantándose de forma superficial con el sustrato cubriendo la raíz. Una vez sembrados, inmediatamente se debe regar en forma abundante y mezclando el riego con la fertilización (Gonzales & Flores, 2010). Los esquejes sembrados deben mantenerse iluminados durante la noche para asegurar un efecto de día largo desde el primer día, manteniéndolas en estado vegetativo para obtener un rápido crecimiento para alcanzar el tamaño deseado, asegurando que no completen 6 horas de oscuridad continuas, esto se logra controlando los tiempos de exposición a luz artificial (Hena Camacho, 2019). Cuando alcanzan el tamaño deseado se suspende la luz, pasando a un tratamiento de día corto, o usando telas oscuras si es necesario. Se realizan despuntes para inducir la ramificación, varias flores en un solo tallo (Tipo Estándar). También, algunas plantas no se despuntan y se conocen como plantas de un tallo (Tipo Spray). Las flores se cosechan con la longitud de tallo apropiadas y el desarrollo de inflorescencia requerido (Rodriguez, 1998).

1.2.1.3 Importancia Económica. Colombia es el segundo exportador de flores a nivel mundial y el primero en América (Camara de Comercio de Bogota, 2015) siendo el primer exportador de claveles, el cuarto en rosas y lirios y el segundo en crisantemos (Colombia Trade, 2019). En el exterior los crisantemos producidos en Colombia tienen una gran demanda debido a su gran variedad y óptima calidad

(Henao Camacho, 2019). De acuerdo con cifras de ASOCOLFLORES en 2019 el crisantemo ocupó el tercer lugar en las exportaciones de flores colombianas, con el 10% y más de 40 mil toneladas de crisantemos transportadas, lo que representa alrededor de 150 millones de dólares, superado por la rosa y el clavel y en 2020 ocupó el 14,7% de las exportaciones de flores. En cuanto a los destinos internacionales del crisantemos, el 74,9% de las exportaciones de crisantemo fueron hacia Estados Unidos, que es el principal comprador de flores colombianas, Reino Unido (10,32%), Chile (5,56%) y Australia (2,05%) y también se reparte en destinos como España, Rusia, Holanda y Japón (Red Agrícola, 2020).

En cuanto a la producción de flores a nivel nacional, en 2017 (Instituto Colombiano Agropecuario, 2017) el área cultivada fue de 7.714 hectáreas (Incluyendo flores y follaje), los crisantemos ocupan el 12% de la producción de flores a nivel nacional (Sanabria Nuñez, 2019), principalmente son cultivados en Antioquia, Cundinamarca y algunas regiones del Eje Cafetero. Los crisantemos tipo exportación, para el primer semestre de 2020, el 86,8% salieron de territorio antioqueño, el 13,1% de Cundinamarca y el 0,02% restante, de otras regiones del país (Red Agrícola, 2020) con una importante tendencia de crecimiento en la producción nacional y demanda internacional.

1.2.1.4 Principales Plagas del Cultivo de Flores. La mayoría de estas plagas son polífagas, en el cuadro 3 se muestran las plagas más importantes, las cuales se destacan por dejar pérdidas económicas de gran importancia en cultivos ornamentales alrededor del mundo (Torres & Rios, 2007; Valcarcel-Calderon, 2013):

Cuadro 3. Plagas de interés comercial en cultivos ornamentales.

Plaga	Daño
<i>Tetranychus urticae</i> Koch. (Araña roja)	Acaro polífago, destruye tejidos vegetales, produciendo defoliación y desecación.
<i>Alphis spp.</i> , <i>Myzus spp.</i> (Pulgones)	Áfidos, insectos chupadores, para succionar jugos de la planta, segregando un líquido pegajosos y dulce sobre la planta afectando su desarrollo, debilitamiento, interrupción crecimiento, desecación en ataques severos.

<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Mosca Blanca)	Adultos y ninfas chupan la savia de las plantas, debilitando hojas y tallos. Causando marchitamiento, retraso crecimiento o incluso muerte de plantas en grandes poblaciones.
<i>Frankliniella</i> spp. (Trips)	Son pequeños insectos picadores-chupadores, delgados y de tamaño entre 1-2 mm, se alimentan de tejidos internos y flores. Se asociación como vectores de enfermedades como el tospovirus y diseminación de tizón del fuego, royas y virus en los daños del tejido.

Fuente: Torres y Ríos (2007) y Valcarcel-Calderon (2013).

1.2.2 Generalidades Orden Thysanoptera

1.2.2.1 Descripción y Ciclo de Vida. Son insectos con cuerpo alargado, cilíndrico y de tamaño diminuto entre 1-2 mm de largo. Presentan dos pares de alas largas, angostas con flecos conformados por pelos largos. Generalmente son muy activos, saltan y vuelan con agilidad. Las piezas bucales perforan el tejido vegetal y extraen la savia de la planta y tradicionalmente se consideraban insectos "raspador-chupador" y en los últimos años se han presentado avances dentro de la microscopia electrónica y se ha optado por denominarlo "picador-chupador" (Capinera, 2020).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica especies Trips en cultivos ornamentales

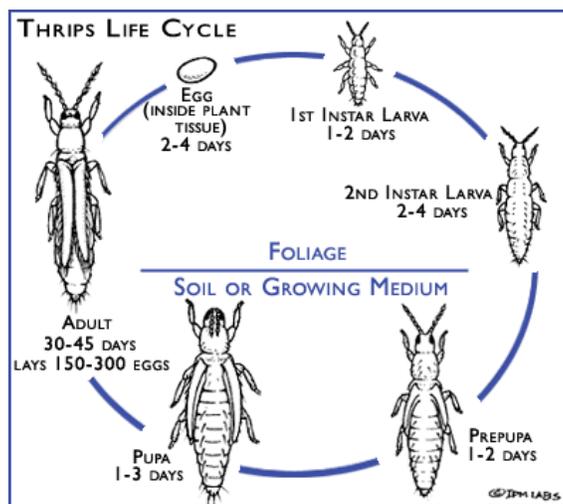
Reino	Animalia
División	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Thysanoptera
Familia	Thiripidae
Género	<i>Franklinella, thrips.</i>

Fuente: Godoy (2014)

El Trips del género *Frankliniella*, es uno de los géneros más representativos del orden Thysanoptera, presenta las etapas de desarrollo de huevo, larva I y larva II,

pre-pupa, pupa como se observa en la figura 2 (Cárdenas y Corredor, 1989; Servicio Nacional de Sanidad, 2019). Estos insectos en sus dos primeros estadios (larvas de primer y segundo instar) se alimentan activamente, pero en los dos últimos estadios son inactivos y ocurren generalmente en el suelo al dejarse caer de la planta. (pre-pupa y pupa) (Capinera, 2020). La duración de cada estado de desarrollo depende de la humedad y temperatura ambiental, bajo condiciones de laboratorio Cárdenas y Corredor (1989) estudiaron el ciclo de vida de la especie *Frankliniella Occidentalis* determinando el rango de duración en días de su ciclo de vida: huevo 4-5, ninfa de primer instar 3-4, ninfa de segundo instar 5-8, pre-pupa 4-6, pupa 3-5 y los adultos alcanzaron una longevidad entre 60 y 121 días. Los estadios ninfales generalmente se asemejan a los adultos en la forma del cuerpo, con menor tamaño y sin desarrollo de las alas. Los Trips pueden encontrarse en las flores y en el follaje (Capinera, 2020). A pesar de su pequeño tamaño pueden ser muy destructivos debido a su capacidad de transmisión de virus en las plantas.

Figura 2. Ciclo de vida Trips *Frankliniella occidentalis*.



Fuente: IPM Labs.

1.2.1.2 Afectación de Trips en Cultivos. Los Trips de las flores *F. occidentalis* se consideran una de las plagas más importantes de cultivos alrededor del mundo ya que tiene un amplio rango de plantas hospedantes, incluyendo pepino, cebolla, pimentón, papa, lechuga y tomate y en cultivos de invernadero afecta varios tipos

de cultivos ornamentales como el crisantemo, causando daño estético y reduciendo su valor comercial (Capinera, 2020; Skinner, et al., 2012). En cultivos ornamentales los Trips causan daño de manera directa, al alimentarse de la planta con su aparato bucal picador-chupador, succionando la savia de los tejidos y produciendo lesiones superficiales o manchas necróticas en pétalos y follajes debido a que en su saliva posee sustancias fitotóxicas que generan decoloración y deformación en flores y follajes (Jessica M Kivett et al., 2015). Afectando la calidad comercial de los productos en ataques severos, además que muchas especies de Trips han generado resistencia a varios insecticidas (Dong-Gang et al., 2016; Loera-alvarado et al., 2017). El daño indirecto se asocia a que en estado adulto los Trips son vectores de tospovirus y pueden destruir un cultivo completo si no se controla. El Virus del Bronceado del Tomate, TSWV (Tomato spotted wilt virus) y tospovirus relacionados infectan más de 1000 especies de planta incluyendo cultivos ornamentales con gran impacto económico, los tospovirus son transmitidos por Trips cuando estos se alimentan de las plantas y se encuentran distribuidos globalmente (Rotenberg et al., 2015).

1.2.1.3 Manejo del Trips. Debido a la tolerancia cero de Trips en cultivos bajo invernadero se hacen necesario buscar un manejo eficiente de poblaciones de Trips en orden de producir cultivos comercialmente viables sin arriesgar la calidad (J.M. Kivett, 2015). Sin embargo, el manejo de Trips es difícil debido a sus características biológicas, su comportamiento críptico ya que los huevos se depositan dentro del tejido de las plantas, los primeros instares larvarios se esconden dentro de las estructuras de la flor protegidos de los productos químicos, los instares puparios normalmente se encuentran en el suelo y los adultos vuelan o se dejan llevar por el viento a otras plantas. Además los Trips tienen un amplio rango de plantas e hierbas hospedantes, alta tasas de reproducción de hembras que incluso se reproducen por partenogénesis, sin necesidad de reproducción sexual con un macho dando solo descendientes hembras, corto ciclo de vida y últimamente se han reportado resistencia a varios insecticidas (Cárdenas & Corredor, 1989; J.M. Kivett, 2015; Restrepo, 2015).

1.2.1.3.1 Control Químico de Trips. Los insecticidas son usualmente aplicados sobre el follaje y flores para minimizar el daño de alimentación y la ovoposición e intentar limitar la transmisión de enfermedades, sin embargo, la resistencia a insecticidas es un efecto que se presenta a nivel global sumado al comportamiento críptico de los Trips. Para el control de esta plaga se realizan aplicaciones de diferentes insecticidas en un programa de rotación, usualmente se recomienda

realizar aplicaciones frecuentes de productos químicos, desde dos aplicaciones, con 5 días de diferencia para afectar las poblaciones de Trips, teniendo en cuenta que estadios como los huevos y estados puparios estarán protegidos del contacto con el insecticida, en un proceso denominado "habito de encapsulado" dentro del tejido vegetal o en el suelo (Capinera, 2020; Restrepo, 2015). Las constantes aplicaciones ocasionan el desarrollo de mecanismos de resistencia a insecticidas, incrementando los costos y el riesgo para operarios y organismos benéficos (Dong-Gang et al., 2016; Restrepo, 2015).

1.2.1.3.2 Prácticas Culturales. El manejo del cultivo influye en la abundancia de Trips e incidencia de enfermedades a la planta, por ejemplo, altas tasas de fertilización de nitrógeno incrementan la población de Trips (Capinera, 2020). También, la presencia de plantas o hierbas alrededor del cultivo se convierten en un refugio para reproducción de Trips y enfermedades de virus y su presencia deben ser eliminadas dentro de programas de sanitización (desyerbe). Se recomienda el uso de barreras para evitar el ingreso de Trips, como por ejemplo el uso mallas finas anti-insectos (40-55 mesh) (Capinera, 2020) o bien usar barreras bajas para reducir dispersión del insecto en el cultivo o a otros cultivos. Otra alternativa dentro del programa de control de plagas, también se recomienda el uso de trampas adhesivas como sistema de monitoreo, permitiendo detectar puntos de infección además de la inspección visual en búsqueda de síntomas del ataque de plagas, se recomienda en cultivos ornamentales que la colocación de trampas adhesivas de color sea justo por encima de las plantas (Daughtrey & Buitenhuis, 2020; Restrepo, 2015).

1.2.1.3.3 Control Biológico de Trips. Se resalta la constante necesidad de evaluar y desarrollar agentes de control biológico contra los Trips. Se ha reportado el uso de parasitoides como el *Ceranisus menes* y *Ceranisus americensis* (Hymenoptera: Eulophidae), dos avispas que han sido investigadas para el potencial control de Trips, con buenos resultados contra el estadio larvario del Trips (Loomans, 2003), sin embargo, estos insectos tienen un tiempo de desarrollo lento. Otros insectos, que han sido reportados como control biológico contra Trips, como el *Orius laevigatus* (Hemiptera: Anrhocoridae); ácaros depredadores en el follaje de los géneros *Neoseiulus*, *Amblyseius* (*A.barkeri*, *N. cucumeris*, *A. limonicus*, *A. swirskii*, *A. degenerans*, *A. montdorensis*) y otros en este grupo (Acari: phytoseiidae). *N. cucumeris* y *A. swirskii* se encuentran comercialmente para aplicaciones en invernaderos; ácaros depredadores en el suelo como el *Geolaelaps* sp. (Acari: Laelapidae), y otros ácaros que habitan en el suelo como

Hypoaspis, *Macrocheles robustulus*, *Stratiolaelaps scimitus*; el escarabajo *Dalotia coriaria*, encontrados comercialmente aunque su cría en masa resulta costosa y nematodos entomopatógenos (Nematoda: Heterorhabditidae y Steinernematidae) (A.J.M., 2003; Capinera, 2020; Mouden et al., 2017). Varios hongos entomopatógenos comunes como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosroseus* y *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*) han sido ampliamente reportados contra Trips y también se encuentran comercialmente (Capinera, 2020; KIRIŞIK y ERLER, 2017; Um et al., 2018).

1.2.3 Hongos entomopatógenos

El uso de hongos como agentes de control biológico contra plagas, permite reducir la densidad de insectos, transmisión de enfermedades y en consecuencia los daños generales al cultivo. Tienen un papel importante dentro de programas de manejo integrado de plagas con varias ventajas en comparación a insecticidas convencionales, ya que reduce los impactos en el ambiente, son más económicos y seguros para los operarios y organismos benéficos (Sinha, Choudhary, & Kumari, 2016).

Restrepo (2015) menciona que las características óptimas de un hongo entomopatógeno son:

- Resistente a condiciones físicas: radiación UV, altas temperaturas y desecación y compatible con otros microorganismos.
- Ser persistente y capaz de formar estructuras que resistan condiciones adversas.
- Presentar bajos valores de DL₅₀ (Dosis letal media) que garanticen alta patogenicidad (>80%).
- Poseer la habilidad de causar transmitirse a más individuos objetivos (epizootias).
- Ser inocuo.

1.2.3.1 Modos de Infección Hongos Entomopatógenos. Hay hongos que pueden invadir insectos muertos y son llamados saprófagos y hongos que infectan insectos vivos llamados entomófagos, y dentro de los 1,5 a 5,1 millones de especies de hongos en el mundo aproximadamente entre 750 y 1.000 son entomopatógenos fúngicos que se encuentran en más de 100 géneros, pero poco más de 10 han sido empleadas en el control biológico de insectos comercialmente (Araujo & Henrique, 2009; Esparza, Conteiro, & Fraga, 2017). Los hongos entomopatógenos atacan un amplio rango de insectos plagas de cultivos,

pertencientes a los órdenes Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y Thysanoptera (Sinha et al., 2016). Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen un hongo como agente causal. Los hongos tienen un único modo de infección, llegan al hemocele a través de la cutícula o posiblemente a través de las piezas bucales o cavidades del insecto. La cutícula representa el primer punto de contacto y barrera entre el hongo y el insecto. La muerte del hongo es el resultado, de una combinación de factores: daños mecánicos resultantes de la invasión de los tejidos, agotamiento de recursos nutritivos, micosis y producción de toxinas en el organismo, como se observa en la figura 3, los hongos entomopatógenos presentan varias fases en el desarrollo de una micosis (Albuquerque & Albuquerque, 2009; Restrepo, 2015; Sinha et al., 2016):

1. Adhesión: primer paso para la infección, se refiere a la unión de la estructura del hongo a la cutícula del insecto, mecanismos no específicos de adhesión controlado por las propiedades hidrofóbicas de los conidios (En el caso de *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*) o propiedades hidrofílicas (*Verticillium lecanii*).

2. Germinación: en condiciones favorables de humedad, temperatura y requerimientos nutricionales en la cutícula, los conidios pueden producir estructuras de penetración a través de la cutícula como tubos germinativos y apresorio, o por aberturas naturales. En los insectos, específicamente la composición de los lípidos epicuticulares pueden jugar un rol en hacer difícil el proceso de germinación haciendo poco accesibles fuentes de energía para los conidios y también pueden presentar actividad anti fúngica que podría inhibir el crecimiento de las hifas. Es en la superficie cuticular donde se decide las interacciones que conducen a la micosis por parte del patógeno o a una defensa exitosa por parte del huésped.

3. Penetración: la penetración a través de la cutícula implica la combinación de procesos físicos, por la presión de la hifa sobre las áreas membranosas a través de estructuras especializadas como el tubo germinativo y químico, secreción de enzimas hidrolíticas, asimiladoras y desintoxicantes (proteasas, lipasas/estereasa, quitinasas, catalizadores, citocromo P₄₅₀) que facilitan la descomposición del tegumento. Cavidades naturales del insecto como la abertura bucal, recto, regiones intersegmentales y tarsos son áreas comunes de penetración.

4. Multiplicación del hongo en el hemocele: por medio de cuerpos hifales (blatosporas). El insecto puede dar una respuesta a la infección a través de mecanismos humorales (fenoloxidasas, lecitinas, proteínas y péptidos de defensa) y/o celulares (fagocitosis, encapsulación). El hongo a medida que crece en el hemocele del insecto en contacto con los nutrientes aumenta la superficie fúngica a través de la dispersión en el sistema circulatorio del insecto. Este periodo de incubación varía entre las especies y de diferentes factores como la humedad y la temperatura.

5. Producción de toxinas: Estas sustancias pueden producir la muerte del insecto por sus propiedades biocidas e inhibidores de mecanismos de defensa.

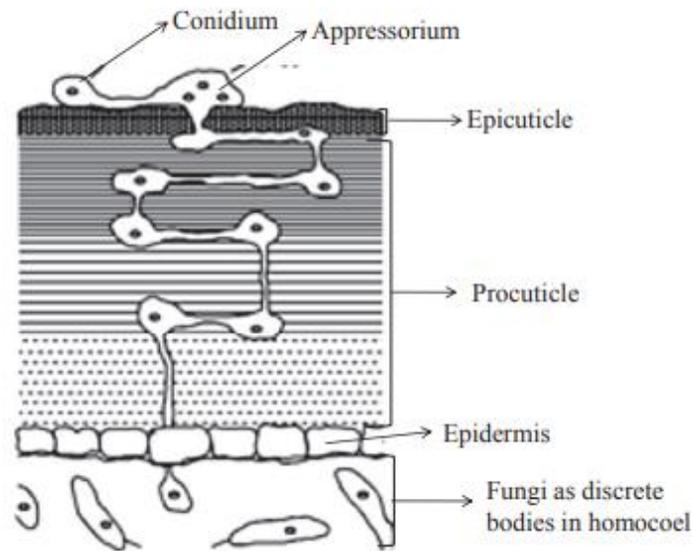
6. Muerte del insecto: debido a la acumulación de varios factores incluyendo el agotamiento de nutrientes, obstrucción física o invasión de órganos y toxicosis.

7. Colonización total hospedante: después de su muerte, el hongo crece saprofiticamente e invade todos los tejidos y órganos internos y se produce el proceso de "momificación", envoltura total del insecto por el hongo

8. Emergencia del hongo al exterior: en buenas condiciones ambientales, las hifas atraviesan el tegumento del insecto ocurriendo en regiones menos esclerosada del tegumento (membranas intersegmentales o espiráculos).

9. Esporulación: las hifas pueden entrar en una fase vegetativa o iniciar la fase reproductora o de esporulación dependiendo de factores ambientales, que influyen en la producción de conidios, su supervivencia y su germinación por lo que están relacionados a la capacidad del hongo de causar epizootias.

Figura 3. Proceso de infección de *Beauveria bassiana*, de acuerdo con Clarkson y Charnley (1996).



Fuente: Sinha et al., (2016)

En general el mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos es complejo y existe la necesidad de seguir estudiando el proceso de infección. En los últimos años se ha incrementado el uso de hongos entomopatógenos en la agricultura debido a sus ventajas de selectividad contra insectos objetivo y no contra organismos benéficos, persistencia en el suelo o en insectos muertos para repetir el ciclo de infección, tienen bajo impacto ambiental, son inocuos para el hombre y el ambiente y son una alternativa ante la constante generación de resistencia a insecticidas, además que estos se consideran perjudiciales a la salud de las personas y el ambiente (Esparza et al., 2017; Restrepo, 2015). La necesidad de comprender del proceso de infección por diferentes cepas de hongos permite la evaluación y desarrollo de nuevos agentes de control biológico eficaces para el uso en campo contra diferentes plagas de cultivos como el Trips.

1.3 MARCO HISTORICO

Dentro de la revisión, se encontraron cepas de *Penicillium sp.* y *Thrichoderma sp.* referenciados en estudios asociados a aislamientos y pruebas de virulencia y patogenicidad en insectos de los órdenes Orhoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Diptera, Acari, Blattodea, Hymenoptera, Coleoptera. Se presentan algunas referencias resaltadas a continuación, con variación entre los ensayos.

Mukherjee, A. et al., (2019) realizaron aislamientos y caracterización de cepas de hongos nativas de suelo y evaluaron su patogenicidad contra el áfido de la papaya

Aphis gossypii Glover, de los 9 aislamientos de *Penicillium* sp, 5 cepas presentaron mortalidad con valores entre 40-70%.

Pal y Ghosh (2014) realizaron aislamientos fúngicos de muestras de suelo y evaluaron su potencial entomopatogénico contra larvas de *Leucinodes orbonalis* una importante plaga de cultivos de berenjena, encontrando que la cepa *Penicillium expansum* presentaba micosis contra tres estadios larvarios del insecto, sin embargo solo registró un 40% de mortalidad acumulada frente a larvas de *L. orbonalis* a concentración de 1×10^8 conidias/mL en 13 días de ensayo.

Herlinda et al., (2020) evaluaron 4 aislados fúngicos de la rizosfera de varias plantas, dos de ellos eran *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, el objetivo del estudio era confirmar la identidad y mortalidad de estos hongos entomopatogénicos promisorios contra larvas *Stodoptera litura*, las otras dos cepas resultaron en nuevos aislados entomopatogénicos, una de ellas era de *Penicillium citrinum* la cual registró una mortalidad de 98,67% contra larvas de tercer instar de *S. litura*, siendo la más alta mortalidad del estudio, superior a *B. bassiana* y *M. anisopliae* (86,67%).

Saady y Mansoor, (2021) aislaron cepas *Penicillium marneffe* y *Verticillium lecanii* asociadas a mosquitos *Culex pipiens* y compararon su eficiencia contra larvas de segundo y tercer instar de *Culex pipiens*. Encontrando que *P. marneffe* no tenía diferencias significativas contra *V. lecanii* y presentó valores altos de mortalidad entre 83,92% y 68,83% para larvas de segundo y tercer instar respectivamente.

Rosa et al., (2020) referencia varios estudios sobre hongos entomopatogénicos entre los que incluyen cepas de *Penicillium* sp., que se han utilizado como bioinsecticidas contra la mosca doméstica (*Musca domestica*) en fase larvaria como control de mosquitos adultos (*Aedes aegypti*).

Elhakim, et al., (2020) evaluaron la virulencia de cepas entomopatogénicos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, y *Trichoderma harzianum*, contra la araña roja, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *T. harzianum* fue menos letal, pero alcanza una mortalidad de 63,75% y no hubo diferencias significativas entre los ensayos.

Batool et al., (2020) referencian que *Beauveria bassiana* y *Trichoderma asperellum* están siendo ampliamente utilizados en diferentes cultivos como entomopatogénicos de plagas y han demostrado su eficacia en el crecimiento de las plantas, en su estudio valoraron el potencial sinérgico de *B. bassiana* y *T.*

asperellum, que por separado presentaban mortalidades sobre larvas de *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) de 88% (*B. bassiana*) y de 55% (*T. asperellum*), mientras que en combinación incrementaban la mortalidad en un 98,3%.

Gracia et al., (2018) realizaron aislamientos fúngicos de insectos muertos recolectados pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera y Diptera con signos de infección, cepas *Trichoderma atroviridae* y *Trichoderma harzianim* presentaron mortalidades inferiores a 10% similares al testigo contra larvas de tercer instar de *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) sin embargo, resaltan los autores es el primer registro de estas cepas asiladas de estos insectos consideradas normalmente como saprofitos o endófitos.

Erol et al., (2020) evaluaron la virulencia de cepas entomopatógenas *Beauveria bassiana*, *Verticillium alfalfae*, y *Trichoderma viride* y metabolitos secundarios de *B. bassiana* y *V. alfalfae* contra áfidos *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Al final del ensayo *T. viridae* logró mortalidades de 93,33% sin diferencias significativas con los demás ensayos donde la mortalidad varió entre 73,33 a 100%.

Para el orden Thysanoptera se encontraron pocos estudios relacionados a las cepas *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* Panyasiri, et al., (2007) evaluaron el potencial entomopatógeno de cepas fúngicas para el control de plagas de cultivo de tomate de invernadero: Trips *Ceratohripoides claratris*, mosca blanca *Bemisia tabaci* y cochinilla *Pseudococcus cryptus*. Cepas de *Penicillium sp.* presentaron tasas de mortalidad entre 0-13,33% para *C. claratris*, 6,7-23,3% para *P. cryptus* y 0-23,33% para *B. tabaci*, aun cuando las cepas de *Penicillium sp.* fueron recuperados de insectos adultos muertos de Trips. Restrepo (2015) realizó aislamientos fúngicos de adultos Trips muertos, encontrando que el 20,29% eran cepas de *Penicillium sp.* del total de aislamientos, considerado generalmente un hongo saprofito. Muvea, A. et al., (2014) evaluaron la colonización de hongos endofitos sobre tejidos de cebollas y su impacto en la biología de *Thrips tabaci*. Plantas colonizadas con *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* junto con *Clonastachys rosea* y *Hypocrea lixii* mostraban menos signos de alimentación y menor cantidad de ovoposición de *T. tabaci*, concluyendo que estas cepas influían en su comportamiento.

2. METODOLOGÍA

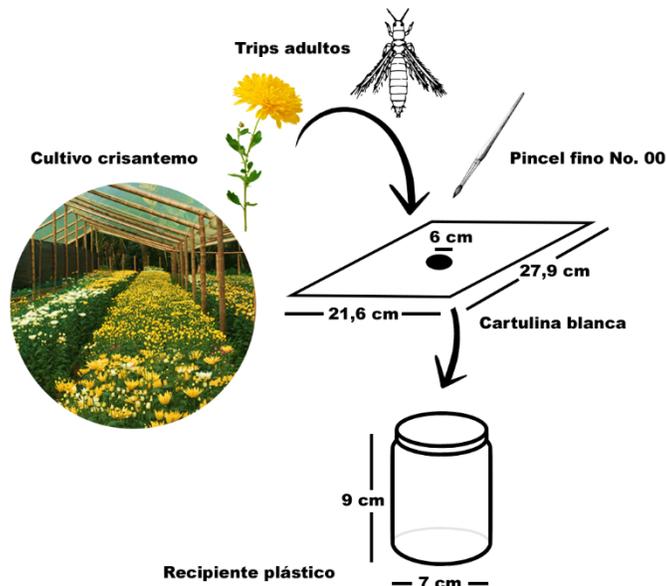
2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS PRESENTES EN LA COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA FRENTE A DIFERENTES ESTADIOS DE TRIPS COMO PLAGA DEL CULTIVO DE FLORES, BAJO CONDICIONES *In vitro*

A continuación, se describe la metodología para evaluar la actividad antagonica de cepas de hongos frente al Trips bajo condiciones de laboratorio. Las colonias de Trips fueron obtenidas de cultivos de crisantemos en el corregimiento de Tunia, en el municipio de Piendamó, Cauca. Los Trips fueron criados en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca en condiciones controladas de luz y temperatura, para obtener diferentes estadios que fueron usados en los ensayos de laboratorio. Las cepas hongos a evaluar estaban presentes en la colección del grupo de investigación ASUBAGROIN, las cuales fueron caracterizadas macro y microscópicamente en 4 cepas de *Penicillium sp.* y 3 cepas de *Trichoderma sp.* Los bioensayos para evaluar la mortalidad y el tiempo medio letal (TL₅₀) fueron realizados sobre tres estadios de Trips: larvas de segundo instar, pupas y adultos. Los resultados fueron analizados estadísticamente y con ayuda de la literatura en la discusión para escoger la mejor cepa para utilizar en la evaluación en invernadero.

2.1.1 Obtención de Trips

Se realizó un recorrido en varias fincas productoras de flores, en el municipio de Piendamó, debido a que reúne el mayor número de floricultores del departamento. Las muestras se recolectaron en cultivos de flores del corregimiento de Tunia en plantas que presentaban sintomatología de ataque por Trips. Para el muestreo se utilizó una superficie de cartulina blanca de 21,6 x 27,9 cm con una abertura en el centro de diámetro 6 cm conectada a un recipiente plástico de 7 cm de diámetro y 9 cm de alto. Las flores de las plantas afectadas se sacudieron sobre la cartulina blanca, sin arrancarlas, y con ayuda de un pincel fino (No. 00) se llevaron los Trips al recipiente como se observa en la figura 4 (Loera-alvarado et al., 2017). Los frascos plásticos con los Trips recolectados fueron llevados al laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Cauca.

Figura 4. Recolección de Trips.



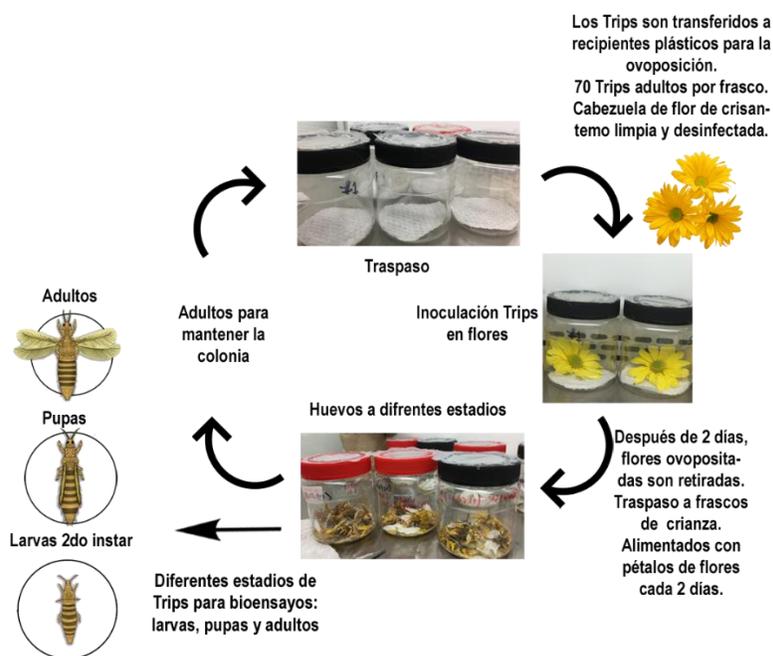
Fuente: Elaboración propia.

2.1.2 Crianza de Trips

Se siguió la metodología descrita por Mortazavi et al. (2015) con algunos ajustes de acuerdo al ciclo de vida estudiado por Cárdenas y Corredor (1989) y Salamanca et al. (2010). Los Trips recolectados fueron traspasados a nuevos recipientes en la cabina de flujo laminar y con ayuda de un pincel extrafino (No. 000) fueron traspasados a recipientes plásticos de 9 cm de alto y 7 cm de diámetro, con agujeros en las tapas de 6 cm cubiertos con tela de serigrafía para permitir ventilación y evitar escape de los Trips los cuales contenían una lámina de papel filtro en el fondo para controlar el exceso de humedad, como fuente de alimento y sitio de ovoposición se usaron cabezuelas de flores amarillas de crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) provenientes de un cultivo de flores, asegurándose de que no presentaran otras plagas. Estas cabezas florales frescas fueron lavadas 2 horas antes de su uso, sumergidas durante 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio 0.5%, para remover agentes contaminantes y posteriormente enjuagadas en agua abundante (Buitrago, Muñoz, Bustos, & Cantor, 2010), en cada recipiente se depositaron 70 Trips adultos entre machos y hembras (frascos de ovoposición) y se mantuvieron en un régimen de fotoperiodo

de 16:8 (luz: oscuridad) a temperatura ambiente. Luego de dos días de incubación las flores ovopositadas se trasladaron a un nuevo recipiente (frascos de crianza) y se dejó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente hasta la eclosión de los huevos y desarrollo de los estadios. En todos los recipientes cada 2 días se introdujo una flor fresca y se realizó el cambio de las flores contenidas en los frascos de ovoposición a los frascos de crianza. De igual manera se aplicaron entre 10 a 12 gotas de agua para mantener la humedad (Figura 5).

Figura 5. Crianza de Trips en laboratorio.



Fuente: Elaboración propia.

2.1.3 Obtención de Hongos

Se seleccionaron 7 cepas de *Penicillium sp.* (*Penicillium sp.* 321, *Penicillium sp.* 313, *Penicillium sp.* 121 y *Penicillium sp.* 129) y *Trichoderma sp.* (*Trichoderma sp.* 311, *Trichoderma sp.* 323 y *Trichoderma sp.* 25), procedentes de la colección del grupo de investigación ASUBAGROIN del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca.

2.1.4 Activación de los Hongos

Para su activación, los hongos mantenidos en conservación fueron inoculados en medio de cultivo Cloranfenicol Glucosa Agar (CGA) y se llevaron a incubación a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 12 días. Posteriormente se realizó la identificación taxonómica.

2.1.4.1 Identificación Taxonómica de Hongos. Se analizaron características macroscópicas y microscópicas, las cuales se compararon con información tomada anteriormente de la colección para constatar la identificación de las cepas conservadas. Para la descripción macroscópica se verificaron características como color, topografía (rugosa, umbonada, verrugosa, aplanada) y textura (algodonosa, aterciopelada, granular o polvorienta y glabrosa) (Giraldo & Villa, 2016). Para la descripción microscópica, se aplicó una tinción con azul de lactofenol y se diferenciaron las estructuras reproductivas de los hongos activados (Arias & Perez, 2008).

2.1.5 Pruebas de Patogenicidad Bajo Condiciones de Laboratorio

2.1.5.1 Diseño Experimental. Para los bioensayos en laboratorio se planteó un diseño completamente al azar por triplicado con arreglo factorial 7×3 , con dos factores: cepas de hongos a evaluar y los estadios del Trips como se especifica en el cuadro 5. Como variable de respuesta se midió el porcentaje de mortalidad y tiempo medio letal (TL_{50}).

Cuadro 5. Diseño experimental ensayo en laboratorio.

Factores	Niveles	Variables de respuesta
Hongos	7 cepas	Porcentaje de mortalidad Tiempo Letal (TL_{50})
Estadios de Trips	3 (Larvas de segundo instar, pupas y adultos)	

Fuente: Elaboración propia

2.1.5.2 Preparación de la Solución de Hongos. Para los ensayos de patogenicidad se preparó una suspensión de esporas de los aislamientos de los hongos identificados; para esto los hongos activados en medio de cultivo sólido Cloranfenicol Glucosa Agar (CGA), se mantuvieron en incubación durante 12 días

a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizó un raspado del micelio, el cual se colocó en 10 mL de agua destilada estéril y se procedió a cuantificar la concentración mediante conteo en la cámara de Neubauer hasta alcanzar la concentración de 2.6×10^6 conidios/mL.

2.1.5.3 Bioensayos en Laboratorio. Los bioensayos se basaron en la metodología descrita por Kivett J. (2015) con algunos ajustes teniendo en cuenta las tres etapas de vida del Trips 1. estadios de larvas de segundo instar, 2. Trips adultos y 3. Pupas. El experimento se desarrolló como se describe a continuación: en placas de Petri de vidrio se colocó papel filtro sobre la base de la caja de Petri y se trató con 1 mL de la suspensión de hongos asignada o 1 mL de agua destilada como tratamiento control, se distribuyó de manera uniforme en todo el papel filtro. A continuación, para el bioensayo 1 se introdujeron 10 larvas de segundo instar de 6 días de edad, para el bioensayo 2 se introdujeron 10 Trips adultos de 2 días de edad y para el bioensayo 3 se introdujeron 10 pupas de 14 días de edad. Se proporcionaron 3 pétalos de flores (previamente desinfectados) como fuente de alimento los cuales se reemplazaron una vez durante la duración de los bioensayos (Bioensayo 1: 7 días, bioensayo 2: 9 días y bioensayo 3: 9 días). Las cajas de Petri se sellaron con papel parafilm para evitar que los Trips escaparan y poder controlar la humedad. Las cajas de Petri se mantuvieron en la incubadora a $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Todos los bioensayos tuvieron un tratamiento control, en las mismas condiciones en la caja de Petri descritas anteriormente con igual número de larvas, pupas o adultos, según el tratamiento. El seguimiento de los bioensayos se realizó hasta que los individuos de Trips cambiaban de estadio en el tratamiento control. Para el bioensayo 1 (larvas) se finalizó al día 7, para el bioensayo 2 (adultos) al día 9 y para el bioensayo 3 (pupas) al día 9.

En los bioensayos 1, 2 y 3 el número de larvas, adultos y pupas de Trips muertos fueron registrados durante el tiempo de los bioensayos con inspecciones cada dos días, con ayuda del estereoscopio se pinchó suavemente con un pincel de punta fina los individuos de Trips, aquellos que no presentaron movimiento se consideraron muertos.

Los individuos muertos fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 0,5% durante cinco minutos y luego lavados con agua destilada estéril, se pasaron por papel filtro para remover el exceso de agua (Restrepo, 2015). Posteriormente se prepararon cajas de Petri con papel filtro humedecido con 1 mL de agua destilada

estéril donde se depositaron los Trips muertos, se selló la caja de Petri con parafilm, y se llevaron a incubación a 28°C durante 8 días. Transcurrido este tiempo con ayuda de un estereoscopio se hizo revisión de crecimiento micelial en los individuos muertos, de aquellos que presentaron micelio se tomaron muestras al azar y se inocularon en cajas con medio de cultivo Clorofenicol Agar, estas cajas se llevaron a incubación durante 6 días a 25°C donde se evaluó crecimiento y se confirmaron sus características macro y microscópicas.

Con la información obtenida se determinó el porcentaje de mortalidad (Ec. 1) y el TL₅₀, de cada hongo sobre los tres estadios del Trips. Con los valores estadísticos se realizó prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Duncan en el programa estadístico SPSS. La cepa que presentó mejores resultados en los diferentes bioensayos en laboratorio se llevó a pruebas en invernadero para su validación.

$$\%mortalidad = \frac{Trips\ muertos}{Trips\ iniciales} * 100\% \quad \text{Ec. 1}$$

2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS HONGOS SELECCIONADOS PARA EL CONTROL DE TRIPS MEDIANTE CONDICIONES DE INVERNADERO

A continuación, se describe la metodología para evaluar la actividad biocontroladora de hongos seleccionados para el control de Trips bajo condiciones de invernadero. Se adecuó un invernadero, donde se realizó el manejo de las plantas de crisantemo desde su enraizamiento hasta los ensayos, siguiendo recomendaciones de riego y fertilización. Se describen las pruebas de fitotoxicidad realizadas en plantas de crisantemo con dos hongos que obtuvieron buenos resultados frente a diferentes estadios de Trips en condiciones *In vitro* en un tiempo de ensayo de tres semanas, en este ensayo se escogieron las variables de evaluación de nivel daño en las plantas: follajes y flores, para la elaboración de una escala de calidad para poder comparar en los ensayos en invernadero. Para el desarrollo de la evaluación en invernadero se construyeron jaulas de plástico [(45,7x45,7x100 cm largo x ancho x alto)] donde se introdujeron las plantas de crisantemo en macetas y se realizó la infestación de Trips. Se realizaron 6 tratamientos, un tratamiento con la formulación de hongo que mostró buenos resultados en la fase laboratorio, una cepa de hongo entomopatógeno comercial, un tratamiento químico con un insecticida muy usado en la región, y tratamientos

control con o sin infestación de Trips y plantas sin aplicación como control. La capacidad biocontroladora de los tratamientos frente al Trips se midió usando cintas adhesivas blancas durante 3 semanas, las cuales fueron analizadas en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la universidad del Cauca haciendo conteo y revisión de los Trips atrapados. Al final del ensayo se realizó una evaluación de calidad de las flores y el follaje en todos los tratamientos.

2.2.1 Manejo de Plantas de Crisantemo en Invernadero

2.2.1.1 Adecuación de Invernadero. Se siguió la metodología de manejo de cultivo de acuerdo con la literatura revisada (Edwin & Giraldo, 2017; Henao Camacho, 2019) y la recopilación de diferentes recomendaciones de productores de flores de la región; el montaje se realizó en la finca productora de flores: “Flores Belén del Cauca”, ubicada en el municipio de Piendamó, Cauca. Las dimensiones del invernadero fueron 4 metros de largo por 4 metros de ancho, encerrado en plástico de invernadero y en los laterales con malla polisombra negra. Dentro del invernadero se ubicaron 4 bancos de madera de 3 m de largo y 45 cm de ancho, separados entre sí por 45 cm y a una distancia de 42,5 cm de las paredes laterales del invernadero, en estos bancos se ubicaron las jaulas con las macetas que contenían las plantas a evaluar (Figura 6).

Figura 6. Montaje de invernadero ubicado en Piendamó, Cauca.



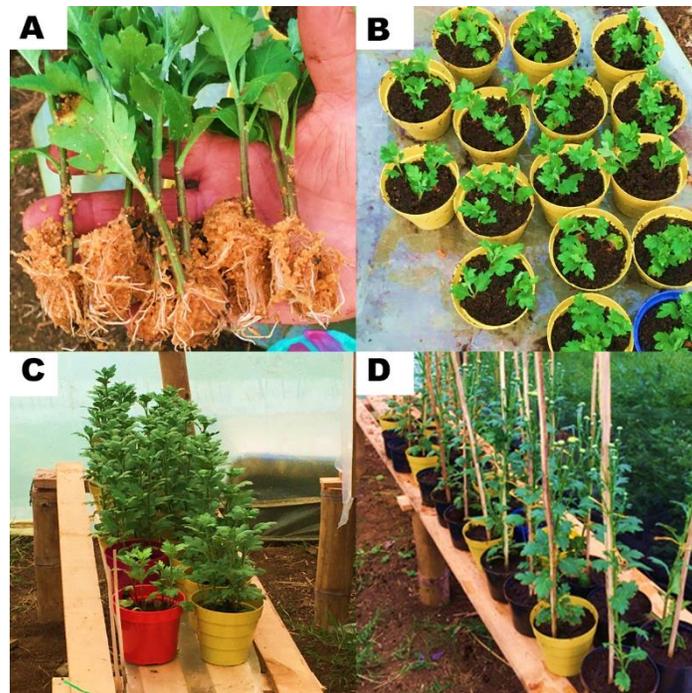
Fuente: elaboración propia

A: Invernadero y B: Bancos de madera

2.2.1.2 Obtención de Esquejes. Para este estudio se consiguieron los esquejes enraizados de 15 días los cuales tenían una longitud entre 7-10 cm y de 4 a 5 yemas. Estos esquejes fueron obtenidos a partir de las puntas de las ramas de un cultivo de plantas madres totalmente libres de plagas y enfermedades, provenientes de un cultivo de flores (“Finca de Flores Ana María”) ubicado en el municipio de Piendamó, Cauca.

2.2.1.3 Trasplante y Manejo de las Plantas. Los esquejes enraizados se colocaron en macetas de 15 cm de diámetro, una planta por maceta, con compost como sustrato para la planta. Las cuáles se mantuvieron durante todo el ensayo en el invernadero de plástico evitando el ingreso de plagas y enfermedades. Para el riego diariamente se aplicó agua directamente al sustrato usando una regadera evitando que se humedeciera el follaje. Todas las plantas fueron fertilizadas de acuerdo con las recomendaciones del técnico durante el proceso en las fechas establecidas (Figura 7).

Figura 7. Manejo de plantas de crisantemo.



Fuente: elaboración propia

A: Esquejes enraizados, B: siembra de plantas macetas 14 cm, C: Plantas de 4 semanas y D: plantas de 6 semanas con guadua/bambú.

2.2.2 Pruebas de Patogenicidad en Invernadero

2.2.2.1 Preparación de los Hongos. Los hongos se activaron de acuerdo con la metodología descrita anteriormente en el punto 2.1.5.2 se ajustó el inóculo a 5×10^7 esporas/mL. Esta concentración se escogió para igualar la dosis recomendada contra Trips en cultivos ornamentales usando el producto biológico comercial *Beauveria bassiana* (ADRAL®s.c.). El estudio se realizó desde la semana 6, cuando ocurre el desarrollo del botón florar en un cultivo de flores, evaluándose la formulación del hongo que logró buenos resultados de potencial biocontrolador frente a Trips en condiciones *In vitro*.

2.2.2.2 Prueba de Fitotoxicidad. Como ensayo preliminar se evaluó la fitotoxicidad de dos hongos que mostraron buenos resultados en las pruebas de laboratorio contra los estadios de Trips. Se siguió la metodología de Kivett (2015). Se usaron 12 plantas de crisantemo de 6 semanas tomadas de la finca “Flores Belén del Cauca”, las cuales se traspasaron a macetas de 14 cm con una planta por maceta. Fueron asignadas 4 plantas por hongo y 4 plantas como tratamiento control. Cada planta fue rociada usando un espray con el hongo respectivo a una concentración determinada de 1×10^6 conidios/mL en un volumen de 30 mL. Se realizó dos veces la aplicación, dejando un espacio de una semana entre las aplicaciones. A la semana siguiente de la última aplicación se hizo la evaluación de fitotoxicidad de acuerdo con una escala de nivel de daño con información recolectada del estudio de fitotoxicidad sobre gerberas (*Gerbera jamesonii*) de Kivett (2015), con recomendaciones de evaluación de fitotoxicidad para cultivos ornamentales de la Organización de Europa y del Mediterráneo de protección de plantas (2014) y algunas consideraciones de calidad de acuerdo al CBI: *Ministry of Foreign Affairs* respecto a la calidad de crisantemos tipo exportación en Europa (2017) en especificaciones generales para crisantemos en el mercado europeo. Las variables de evaluación de nivel de daño en flores y follajes se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Variables de evaluación nivel daño plantas: follajes y flores

Variables de evaluación	Valor/Escala
-------------------------	--------------

Numero de flores por planta	Numero
Desarrollo de botones florales semana 8	Numero
Decoloración	0 al 100%
• Flores	
• Follaje	
Necrosis	0 al 100%
• Flores	
• Follaje	
Deformaciones/malformaciones	0 al 100%
• Flores	
• Follaje	
Calidad comerciable	Baja, regular, alta

Fuente: CBI: Ministry of Foreign Affairs (2017) y European and Mediterranean Plant Protection Organization (2014).

Con ayuda de esta tabla se usó una escala de calidad de 1 a 5 teniendo en cuenta el nivel del daño del Trips en las plantas de crisantemos propuesta por Kivett (2015). Siendo 1= no daño visible (ningún daño, efecto, apariencia similar al testigo), 2=1 al 25% daño (Daño leve, leve clorosis y retardo en el crecimiento), 3=26 al 50% de daño (daño moderado, clorosis intensa, necrosis y malformaciones pronunciadas pero el cultivo se recupera), 4=51 al 75% de daño (síntomas marcados, cultivo no se desarrolla bien) y 5=>75% daño. (severo daño, perdida de plantas, muerte total).

2.2.2.3 Desarrollo Experimental en Invernadero. Se usaron plantas de crisantemo desde el momento de floración (semana 6) mantenidas en macetas de 15 cm de diámetro usando compost como medio de cultivo. Las macetas se colocaron al azar en jaulas de plástico transparentes individuales [(45.7x45.7x100cm largo x ancho x alto)] dispuestas en filas con un igual número de jaulas ubicadas en los 4 bancos del invernadero. Cada jaula tenía una puerta con bisagras y 3 orificios (12 cm de diámetro) cubiertos con una malla antitrips. Un orificio en la puerta y dos en cada lado de las jaulas. Estas aberturas permitían la ventilación, pero evitaban el escape de los Trips adultos (J.M. Kivett, 2015). El agua se aplicó directamente sobre el suelo evitando mojar el follaje con ayuda de una regadera sin sacar las plantas de la jaula (Figura 8).

Figura 8. Jaulas unidades experimentales.



Fuente: Elaboración propia

2.2.2.4 Infestación de Trips. Cada jaula fue infestada con 35 Trips adultos de 5 días de edad obtenidos en colonias criadas en el laboratorio de biotecnología de la Universidad del Cauca. Para cada tratamiento los Trips se infestaron durante la semana 7. Para estos los Trips fueron transportados desde la Universidad del Cauca a la finca “Flores Belén del Cauca” en recipientes plásticos. Una vez en la finca los recipientes que contenían los Trips fueron sujetos a la guadua que sostenían las plantas, se abrió el recipiente durante un tiempo de 2 horas y se retiraron los frascos (Figura 9).

Figura 9. Infestación de Trips en unidades experimentales.



Fuente: Elaboración propia

2.2.2.5 Diseño Experimental. Se planteó un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 5 réplicas por tratamiento; el factor a evaluar fue el método de control con 3 niveles: biológico silvestre, biológica cepa comercial, químico y tres controles (Tabla 2). Como variable de respuesta se midió la capacidad biocontroladora usando cintas adhesivas y realizando conteo y revisión de Trips adultos atrapados en las cintas y se registró la calidad de las flores y el follaje al final del ensayo de acuerdo a la escala de calidad establecida en el punto 2.2.2.2.

Tabla 2. Descripción tratamientos.

Tratamiento	Tipo	Plantas infestadas con Trips semana 7	Aplicaciones de método de control	Variable de respuesta
T1	Biológico silvestre <i>Penicillium sp. 321</i>	Si	4 aplicaciones semanales desde la semana 6 en las plantas	Actividad biocontroladora Evaluación calidad de flores

T2	Biológico comercial <i>Beauveria bassiana</i> (ADRAL®s.c.)	Si	4 aplicaciones semanales desde la semana 6 en las plantas	Actividad biocontroladora Evaluación calidad de flores
T3	Químico Insecticida CAZADOR® ingrediente activo fipronil	Si	1 aplicación semana 8	Actividad biocontroladora Evaluación calidad de flores
T4	Control: Plantas con infestación de Trips	Si	No se aplicó	Actividad biocontroladora Evaluación calidad de flores
T5	Control: Plantas con aplicación de biológico silvestre <i>Penicillium sp. 321</i>	No	4 aplicaciones semanales desde la semana 6 en las plantas	Evaluación calidad de flores
T6	Control: plantas sin aplicación productos biológicos y químicos y sin infestación con Trips	No	No se aplicó	Evaluación calidad de flores

Fuente: elaboración propia

Para los tratamientos T1, T2 y T5 se preparó una suspensión de esporas de *Penicillium sp. 321* a una concentración en 5×10^7 conidios/mL y este se aplicó aproximadamente 30 mL con ayuda de un espray sobre las plantas, se realizaron 4 aplicaciones como se describe en la tabla 2. Para T3 se hizo una sola aplicación a una dosis especificada en la etiqueta, durante la semana 8, siete días después de la infestación de Trips para permitir que se establecieran por una semana. Para evitar cualquier contaminación cruzada entre los tratamientos, todas las plantas asociadas con cualquier tratamiento dado se rociaron y se devolvieron a sus jaulas antes de aplicar el siguiente tratamiento. Además, los guantes de látex que se usaron durante la aplicación del tratamiento también se reemplazaron después de cada tratamiento para evitar la contaminación cruzada asociada con manejo de plantas. Todas las aplicaciones de tratamiento se realizaron a última hora de la

tarde o temprano en la noche para evitar exponer las esporas de hongos a la luz solar del medio día.

2.2.2.7 Evaluación en Actividad Biocontroladora. Cintas adhesivas blancas (12.7 x 7.6 cm) fueron colocadas dentro de la jaula, aproximadamente a 8 cm sobre la planta sujeta a la guadua que sostenía las plantas en cada maceta. Estas cintas se colocaron durante las semanas 7, 8 y 9, dejándolas durante un espacio de 7 días, momento en el que se reemplazaron por una nueva y las cintas utilizadas se retiraron y fueron transportadas en bolsas plásticas individualmente al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias. Donde se realizó observación con ayuda del estereoscopio para contabilizar los adultos de *Trips* atrapados. Adicionalmente, en el día final del ensayo, las plantas fueron evaluadas en una escala de calidad como se especifica en el punto 2.2.2.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS PRESENTES EN LA COLECCIÓN DEL GRUPO ASUBAGROIN DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA FRENTE A DIFERENTES ESTADIOS DE TRIPS COMO PLAGA DEL CULTIVO DE FLORES, BAJO CONDICIONES *In vitro*

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la actividad antagónica de 7 cepas de hongos frente a 3 estadios del Trips: larvas de segundo instar, adultos y pupas bajo condiciones *In vitro*. Se muestra el sistema de crianza establecido en laboratorio para Trips recolectados de fincas productoras de flores del municipio de Piendamó, Cauca. Se detalla el ciclo biológico obtenido bajo las condiciones dadas y la edad en que se usaron en los diferentes bioensayos. Se describe las características macro y microscópicas de las cepas de hongos divididas en 2 géneros, 4 cepas de *Penicillium* sp. y 3 cepas de *Trichoderma* sp. Se muestran los valores de mortalidad tiempo letal medio (TL₅₀) de las cepas de hongos frente a los 3 estadios del Trips, donde se comparan estos valores con diferentes estudios que usan hongos reconocidos como entomopatógenos contra el orden Thysanoptera. Se presentan los resultados obtenidos al someter los estadios muertos en cámara húmeda para confirmar la muerte por acción del hongo y el desarrollo del proceso de infección. Se escogió la cepa P321 que mostró los mejores resultados en la fase de laboratorio y fue llevada a evaluación en plantas de crisantemo para evaluar la actividad biocontroladora para el control de Trips bajo condiciones de invernadero como estudio preliminar.

3.1.1 Obtención de Trips

En la figura 10 se muestra un cultivo de crisantemos afectados por el Trips de la finca productora de flores “La mina” ubicada en el municipio de Piendamó, Cauca y se muestra el sistema de recolección de Trips. Se capturaron 400 Trips adultos entre machos y hembras en 5 frascos.

Figura 10. Obtención de Trips de un cultivo afectado.

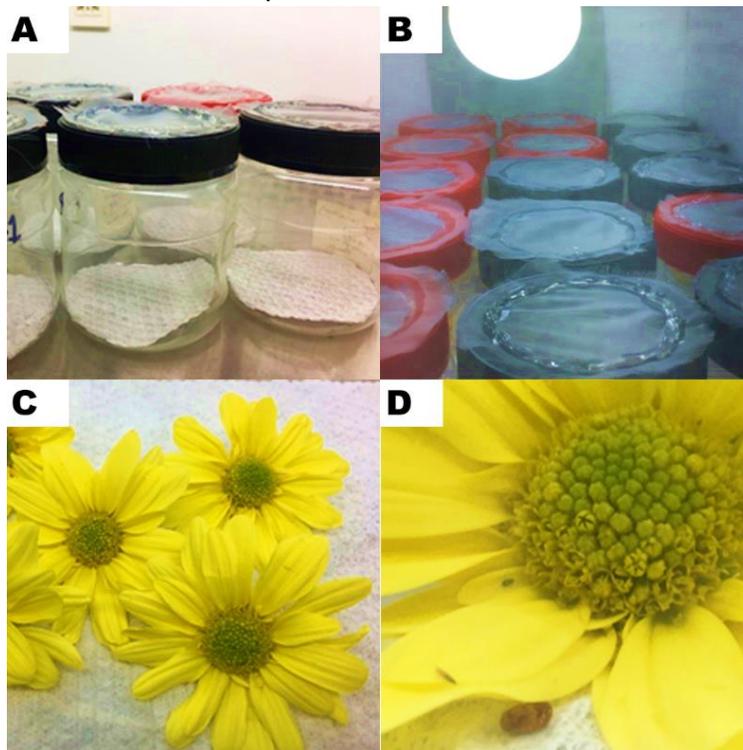


A: Cultivo de crisantemos, B: Flor de crisantemo con signos de necrosis e insectos de Trips visibles y C: Bandeja usada para la recolección de Trips.

3.1.2 Crianza de Trips

En la figura 11 se muestra el proceso de crianza de Trips en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca.

Figura 11. Sistema de crianza de Trips en laboratorio.



A: Recipientes plásticos 7.5x8.5cm, B: sistema fotoperiodo luz LED 9w 16:8 h (Luz:Oscuridad), C: Cabezuelas de flor amarilla crisantemo y D: Trips alimentándose y ovipositando en flores.

Se obtuvieron los diferentes estadios y se determinó un ciclo de vida bajo las condiciones dadas, como se ve en la figura 12. La eclosión de los huevos ocurrió entre el tercer y cuarto día. Esto concuerda con Cárdenas y Corredor en su estudio sobre la biología de *Frankliniella occidentalis* sobre *Chrysanthemum morifolium* L. bajo condiciones de laboratorio (1989) donde la hembra coloca los huevos dentro del tejido vegetal, al tercer día aparecen manchas rojizas en los pétalos del crisantemo y al cuarto día empiezan a emerger las larvas de primer instar.

Frankliniella occidentalis presenta dos estadios larvarios que son etapas activas de alimentación del insecto: larvas de primer instar (L1) y larvas de segundo instar (L2) (Cluever, Smith, Funderburk, & Frantz, 2018; Reitz et al., 2020). Estos estadios se caracterizan porque son pequeñas, no poseen alas, son de color blanquecino-amarillento. Generalmente las larvas de primer instar en flores son difíciles de observar, al igual que Buitrago et al., (2010) que referencias que larvas de primer instar debido a su pequeño tamaño quedan inmersas en la estructura de la flor.

Las larvas de segundo instar fueron observadas en nuestro estudio en el día 6, con una duración aproximada hasta el día 14 antes de pasar a pre-pupa, lo que se denomina larvas tardías. La duración de esta etapa en laboratorio concuerda con Cardenas y Corredor (1989), que también establecieron su duración entre 5-8 días a 25°C en condiciones de laboratorio en flores de crisantemo. Las larvas de segundo instar son de un tamaño relativamente mayor a las de primer instar. En esta etapa es posible observar la diferenciación sexual entre machos y hembras, los machos son más delgados que las hembras.

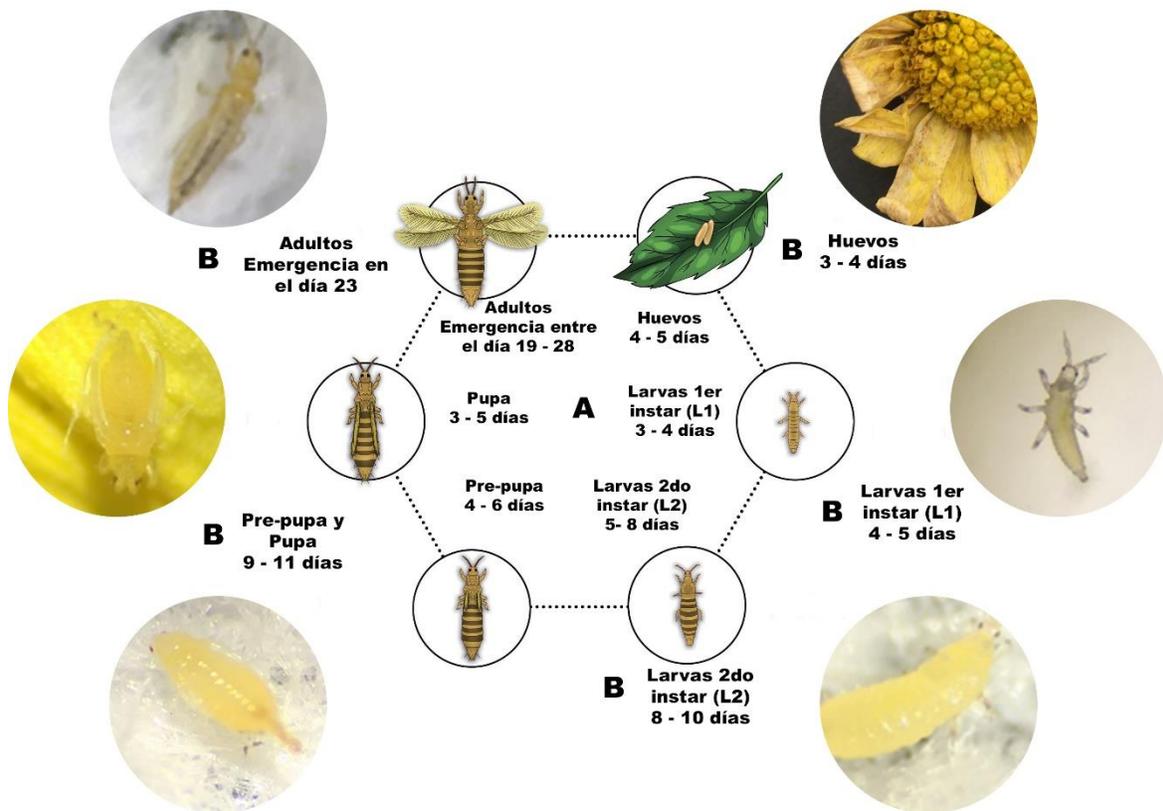
El proceso de pupación, entre el estadio de pre-pupa y pupa tuvo un intervalo de 9 a 11 días, lo que concuerda con Cardenas y Corredor (1989), que registraron una duración entre 7 a 11 días entre pre-pupa y pupa. El estado de pre-pupa se caracteriza por tener yemas alares cortas y antenas que no se retraen sobre la cabeza, mientras que las pupas tienen brotes alares más largos y las antenas están tiradas hacia atrás sobre la cabeza (Cluever et al., 2018). En estos estadios cesan la alimentación y son relativamente inmóviles, normalmente se dejan caer de las plantas y caen en el suelo como sustrato para su transformación, aunque

pueden encontrarse dentro de flores de estructura compleja como el crisantemo (Reitz et al., 2020).

Finalmente, los adultos empezaron a emerger alrededor del día 23. Similar a Cardenas y Corredor (1989), donde los adultos emergían entre el día 19 al día 28. Los adultos se caracterizan por tener alas completamente desarrolladas y los machos suelen constituir una proporción mucho menor de la población y son más pequeños y de color más claro que las hembras (Cardenas & Corredor, 1989; Cluever et al., 2018).

Una vez establecido el ciclo biológico bajo las condiciones de laboratorio descritas, para los bioensayos se usaron larvas de segundo instar de 6 días desde la eclosión de los huevos para el bioensayo 1, se usaron adultos de Trips de 2 días de edad, una vez emergían para el bioensayo 2 y larvas tardías entrando en pre-pupa de 14 días de edad desde la eclosión para el bioensayo 3. Adultos de Trips fueron mantenidos en frascos de ovoposición para mantener la colonia.

Figura 12. Estadios de Trips obtenidos en laboratorio.

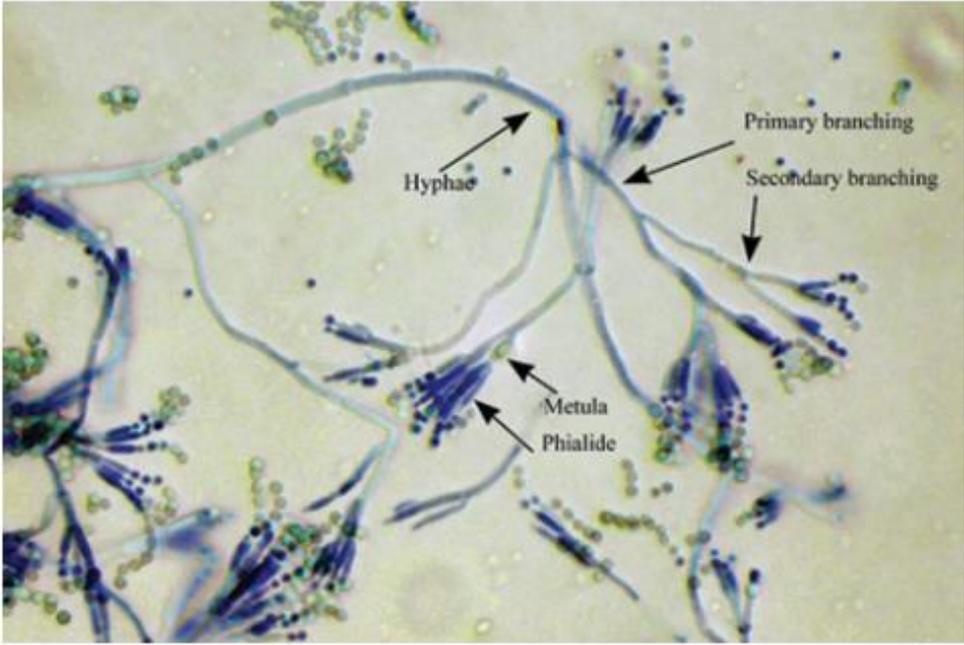


A: Ciclo de vida del Trips de referencia (Cardenas y Corredor, 1989) y B: Ciclo de vida del Trips obtenido en el estudio.

3.1.3 Identificación Taxonómica de Hongos

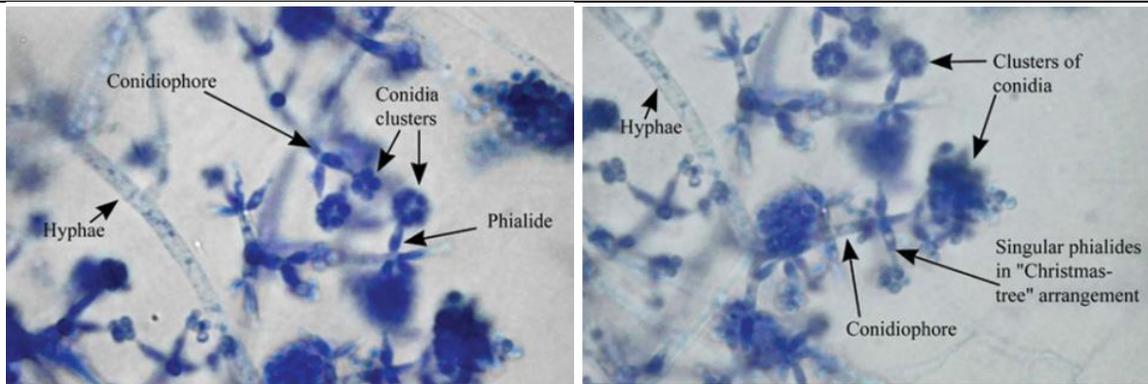
Se identificaron taxonómicamente 7 cepas de hongos, constatando con información tomada anteriormente de la colección. Se registraron bajo 2 géneros, 4 cepas de *Penicillium sp.* y 3 cepas de *Trichoderma sp.* Las estructuras fúngicas encontradas son similares a las fuentes donde se describen las características taxonómicas de hongos de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* (Maza, Pezzlo, & Baron, 1997; Sciortino, 2017; Watanabe, 2010) como se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Características macroscópicas y microscopias del genero *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*

<i>Penicillium sp.</i>
 <p>The image shows a microscopic view of a <i>Penicillium</i> fungus. It features a network of thin, septate hyphae. From these hyphae, primary branches emerge, which further divide into secondary branches. At the ends of these secondary branches are metulae, which bear numerous phialides. The phialides are small, club-shaped structures that produce chains of spores. The overall structure is highly branched and characteristic of the genus <i>Penicillium</i>.</p>
Morfología colonial: las colonias se desarrollan rápidamente y en su mayoría son de color verde, azul-verde, gris-verde, blanco, amarillo o rosa. El reverso es amarillo, marrón claro o rojo. La superficie de la colonia es pulverulenta o lanosa.
Morfología microscópica: Las colonias están constituidas por micelio de hifas delgadas septadas, tienen conidióforos ramificados y no ramificados. Éstos

forman métulas (estructuras hifales cortas por debajo de las fiálides) que dan lugar a fialides en forma de frasco. Las fialides generan las esporas o conidios. Los conidios son redondos, lisos o rugosos y no ramificados. Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada similar a un pincel, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. El verticilo es fundamental en la clasificación del hongo, si hay solo un verticilo de fialides el pincel es mono verticilado.

Trichoderma sp.

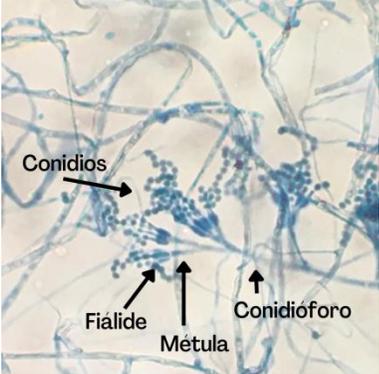
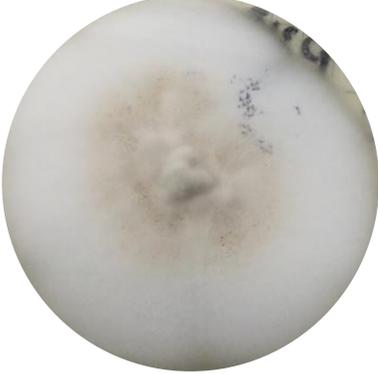
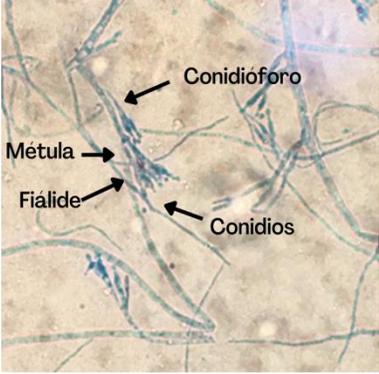


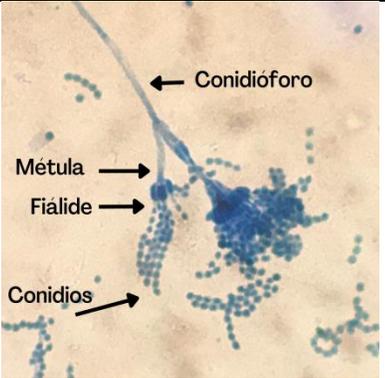
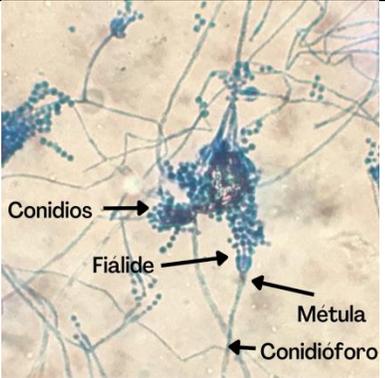
Morfología colonial: las colonias crecen rápidamente, al principio blanco y algodonoso y en pocos días, se forman manchas de color amarillo a verde en la superficie del centro, a veces en anillos concéntricos. El reverso es de color blanco a amarillo.

Morfología microscópica: las hifas son hialinas y septadas. Los conidióforos se producen perpendicularmente a las hifas y luego se ramifican en forma de árbol de Navidad. Las fiálides hialinas están hinchadas en la base y se unen en ángulo recto a los conidióforos. Los conidióforos pueden ser cortos en algunas especies pero muy largos en otras (*T. longibrachiatum*). Los conidios (2-5µm) son ovalados o redondos, de paredes lisas o rugosas, verdes, blancos o amarillos, y forman racimos en las puntas de las fiálides. Las fialidas de *Trichoderma* son singulares, no agrupadas como en *Gliocladium*. Pueden producirse clamidosporas

Las características macroscópicas y microscopias de las cepas estudiadas del género *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Identificación taxonómica de hongos.

Hongo	Características macroscópicas	Características microscópicas
<i>Penicillium</i>		
P321	 <p data-bbox="431 751 870 932">Frente: Color gris con borde color blanco crema Revés: Color amarillo Textura: Aterciopelada Topografía: Rugosa</p>	 <p data-bbox="919 751 1308 898">Estructura reproductiva: hifa, micelio septado, conidióforos ramificados métula, fialides. Conidios redondos</p>
P313	 <p data-bbox="431 1331 870 1512">Frente: Color gris con borde color blanco crema Revés: Centro color blanco crema Textura: Aterciopelada Topografía: Rugosa</p>	 <p data-bbox="919 1331 1308 1478">Estructura reproductiva: hifa, micelio septado, conidióforos ramificados métula, fialides. Conidios redondos</p>

<p>P121</p>	 <p>Frente: Color centro gris oscuro, borde color blanco crema Revés: Color amarillo, borde color blanco crema Textura: Aterciopelada Topografía: Rugosa</p>	 <p>Estructura reproductiva: hifa, micelio septado, conidióforos ramificados métula, fialides. Conidios redondos</p>
<p>P129</p>	 <p>Frente: Centro color blanco crema, con tonalidades color gris parte externa. Revés: Centro color amarillo crema, borde color blanco crema Textura: Aterciopelada Topografía: Rugosa</p>	 <p>Estructura reproductiva: hifa, micelio septado, conidióforos ramificados métula, fialides. Conidios redondos</p>
<p><i>Trichoderma</i></p>		

<p>T311</p>	 <p>Frente: Centro color blanco-amarillo claro Revés: Centro color amarillo crema Textura: Algodonosa Topografía: Aplanada</p>	<p>Conidios Fialide Conidióforo</p> <p>Estructura reproductiva, tipo de hifa septada, conidióforos perpendiculares a las hifas. Fialides hinchadas en la base. Conidios redondos.</p>
<p>T323</p>	 <p>Frente: Centro color amarillo claro con tonalidades verde oliva Revés: Color blanco con anillos Textura: Algodonosa Topografía: Aplanada</p>	<p>Conidióforo Fialide Extensiva producción de conidios</p> <p>Estructura reproductiva, tipo de hifa septada, conidióforos perpendiculares a las hifas. Conidios redondos.</p>
<p>T25</p>		<p>Conidióforo Fialide "Cluster" de conidios</p>

	Frente: Centro color café con borde blanco crema Revés: centro color amarillo crema con borde color blanco crema Textura: Algodonoso Topografía: Velloso	Estructura reproductiva, tipo de hifa septada, conidiforos perpendiculares a las hifas. Conidios redondos. Formando racimos o "clusters" de conidios.
--	---	---

Fuente: elaboración propia

3.1.4 Pruebas de Patogenicidad

A continuación, se presentan los resultados de mortalidad en los diferentes bioensayos en condiciones de laboratorio.

3.1.4.1 Bioensayo 1 Larvas de Segundo Instar

3.1.4.1.1 Evaluación de Mortalidad en Larvas de Segundo Instar. En la tabla 5 se muestran los valores de mortalidad general y mortalidad corregida usando la fórmula de Abbott (Ec. 2), debido a que la mortalidad en el testigo fue mayor al 10% (Brogdon & Chan, 2012). La mortalidad en larvas de segundo instar de *Trips* fue de 20%, posiblemente debido a las condiciones saturadas que se generan dentro de la caja de Petri, similar a lo que referencia Fatnassi et al. (2015), que encuentran que las etapas de *Frankliniella occidentalis* son sensibles a la humedad durante su desarrollo, siendo el rango de humedad relativa entre 65% y 85% más desfavorable para los estadios larvarios y más favorable para las pupas y adultos. La mortalidad corregida fluctuó entre 75% y 0%.

$$\%mortalidad\ corregida = \frac{\%mortalidad\ muestra - \%mortalidad\ testigo}{100\% - \%mortalidad\ testigo} * 100 \quad Ec.2$$

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de larvas de segundo instar de *Trips* causado por cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* 7 días después de la inoculación.

Género	Cepa	Concentración conidios/mL	Mortalidad general (%)	Mortalidad corregida (%)
<i>Penicillium</i>	P321	2,6 x10 ⁶	73,33±5,77	66,66±7,22 ^a
<i>Penicillium</i>	P313	2,6 x10 ⁶	56,67±6,77	45,84±7,22 ^{a,b}
<i>Penicillium</i>	P121	2,6 x10 ⁶	73,33±23,09	66,66±28.87 ^a

<i>Penicillium</i>	P129	2,6 x10 ⁶	70±26,46	62,5±30,24 ^a
<i>Trichoderma</i>	T311	2,6 x10 ⁶	40±10	25±7,22 ^{b,c}
<i>Trichoderma</i>	T323	2,6 x10 ⁶	80±10	75±12,5 ^a
<i>Trichoderma</i>	T25	2,6 x10 ⁶	20±0	0 ^c
Testigo		Agua destilada	20±0	0 ^c

Los superíndices a, b y c muestran los agrupamientos obtenidos por la prueba de Duncan.
Fuente: elaboración propia

El análisis de varianza (ANOVA) indica que existen diferencias estadísticas significativas entre el efecto patogénico de los hongos de género *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* sobre las larvas de segundo instar evaluadas (p: 0,000) a la concentración de 2.6 x10⁶ conidios/mL. Mediante la prueba de Duncan se logró diferenciar los grupos, donde se destacan los hongos P321, P121, P129 y T323 que presentaron el mayor porcentaje de mortalidad con valores entre 62,5 a 75% (grupo a, tabla 4). Mientras que el tratamiento *Trichoderma sp.* 25 no mostró mortalidad igual al testigo (grupo c, tabla 4). Al final del ensayo, la mayor mortalidad se registró usando la cepa *Trichoderma sp.* 323 con un 75% y para las cepas *Penicillium sp.* 321 y *Penicillium sp.* 121 con un 66,66%.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos por otros autores relacionados con el porcentaje de mortalidad de larvas de segundo instar por aplicación de hongos. Se evidencia que nuestros resultados están entre los rangos más altos alcanzados por otros autores contra especies de Trips como el *Frankliniella occidentalis* y *Scirtothrips dorsalis* presentes en cultivos ornamentales utilizando hongos reconocidos como agentes de control biológico como son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride*, *Metarhizium brunneum* y *Isaria fumosorosea*. Además, no se encuentran estudios usando géneros de *Penicillium sp.* o *Trichoderma sp.* contra Trips de cultivos ornamentales, solo se referencia un estudio usando cepas de *Penicillium sp.* contra estados inmaduros de Trips *Ceratothripoides claratis*, considerada una plaga importante de cultivos de tomate.

Tabla 6. Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra larvas de segundo instar Trips.

Autores	Hongo	Inoculo (conidios/mL)	Estadio Trips	Mortalidad (%)
Ge et al., (2020)	<i>Metarhizium flavoviride</i>	1,2x10 ⁶ Inmersión, una	Larvas de segundo instar	72,22

		aplicación	<i>Frankliniella occidentalis</i>	
Ugine et al., (2005)	<i>Beauveria bassiana</i>	8,61x10 ⁶ ±1,09x10 ⁸ Aspersión, una aplicación	Larvas de segundo instar <i>Frankliniella occidentalis</i>	69 - 85
Arthurs et al., (2012)	<i>B. bassiana</i> <i>M. brunneum</i> <i>I. fumosorosea</i>	1x10 ⁸ Aspersión, una aplicación	Larvas de segundo instar <i>Scirtothrips dorsalis</i> Hood	50 75 77
Wraight et al., (2016)	<i>B. bassiana</i> <i>M. brunneum</i> <i>M. anisopliae</i>	1,25x10 ⁸ 4,85x10 ⁷ 4,75x10 ⁷ Aspersión, una aplicación	Larvas segundo instar <i>Frankliniella occidentalis</i>	83 96 96
Panyasiri et al., (Panyasiri et al., 2007)	<i>Penicillium sp.</i>	1x10 ⁷ Inmersión, una aplicación	Estados larvarios <i>Ceratothripoides claratis</i>	0 – 13,3
Este estudio	<i>Penicillium sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Larvas de segundo instar	45,84 - 66,66
Este estudio	<i>Trichoderma sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Larvas de segundo instar	0 - 75

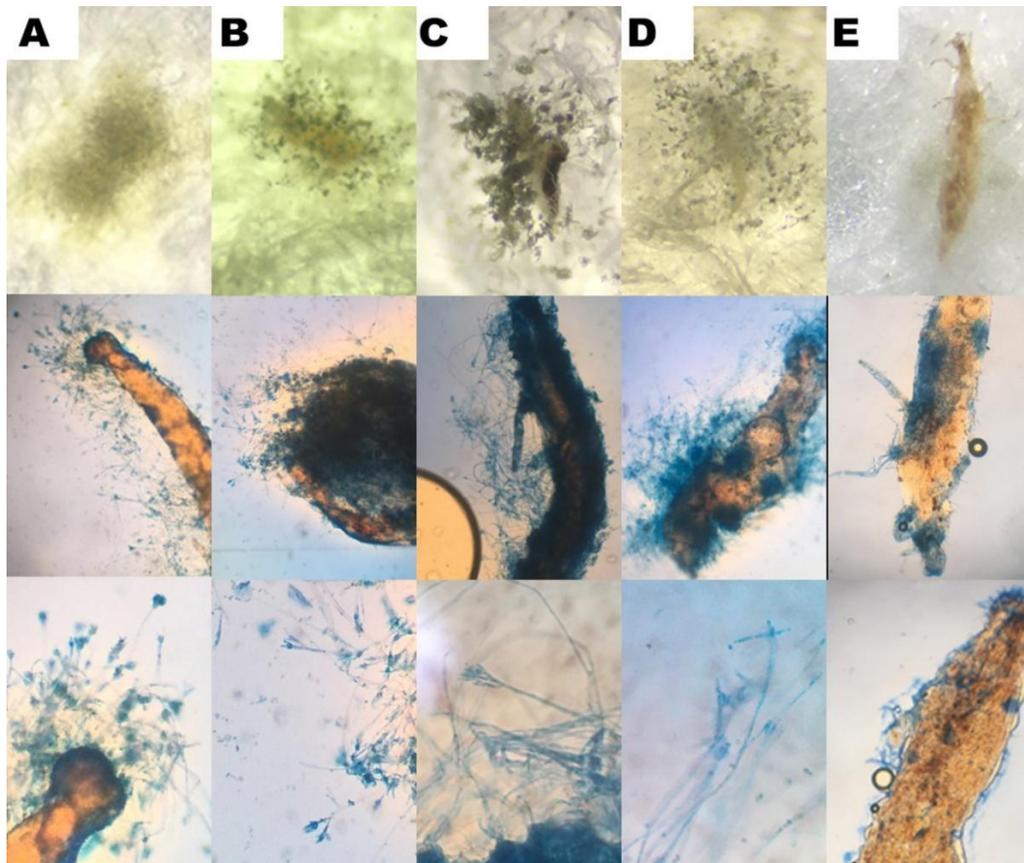
Fuente: elaboración propia

Por otra parte, Thungrabeab et al., (2006) al evaluar el potencial entomopatógeno de 41 aislados fúngicos sobre larvas de *Thrips tabaco* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) clasificaron los hongos estudiados en tres clases de acuerdo al nivel de mortalidad sobre el estado larvario, considerando altamente patógenos si la mortalidad es mayor a 64,49%, moderadamente patógenos si esta entre 64,49-30,99% y poco patógeno a mortalidades por debajo de 30,99%. Igualmente, Góngora, Marín y Benavides (2009) consideran cepas con buena virulencia si causan mortalidades cercanas o superiores al 70% sobre los insectos. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio bajo condiciones de laboratorio las cepas *Trichoderma sp.* 323, *Penicillium sp.* 321 y *Penicillium sp.* 121 se catalogan

como altamente patógenos al mostrar mortalidad desde 66,66 a 75% y la cepa *Trichoderma sp.* 323 se considera de buena virulencia.

En la figura 13 se observa el registro de larvas que presentaron micelio externo luego del tratamiento con cámara húmeda. En la columna A se presentan los resultados de *Penicillium sp.* 321, en la columna B de *Penicillium sp.* 313, en la columna C de *Penicillium sp.* 121, en la columna D de *Pencillium sp.* 129 y en la E de *Trichoderma sp.* 323. En todos los casos al aplicar azul de lactofenol sobre los Trips y llevar al microscopio al objetivo de 10x se observó presencia del hongo de color azul y cuando se aumentó al objetivo de 40x se logró diferenciar hifas y estructuras reproductivas de los hongos respectivos.

Figura 13. Registro cámara húmeda larvas de Trips muertas: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol.



Fuente: elaboración propia

A: cepa P321, B: cepa P313, C: cepa P121, D: cepa P129 y E: cepa PT323

En la tabla 7 se muestra el registro de larvas muertas de Trips que presentaron micelio externo visible con ayuda de estereoscopio en la cámara húmeda. Se observó que la cepa *Penicillium* sp. 321 presenta la mayor proporción de larvas muertas que mostraban desarrollo de micelio externo con un 72,73%. Mientras que en las demás cepas se presentaba menor proporción de micelio externo. Es oportuno mencionar que no todos los Trips muertos desarrollaron micelio externo en cámara húmeda visible con estereoscopio, pero si mostraban desarrollo de hifas visibles con ayuda de microscopio usando azul de lactofenol. El proceso de infección en la producción de micelio sobre el cadáver del insecto está relacionada a la capacidad de esporulación, considerada como un factor de virulencia del hongo que le permite replicarse en el campo (Restrepo, 2015). Además el nivel de infección está relacionado a la dosis de aplicación y edad del insecto, como concluyen Arthurs, Aristizábal, y Avery (2013) quienes evaluaron cepas de hongos entomopatógenos *Beuveria bassiana*, *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea* contra larvas de segundo instar y adultos de Trips *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thiripidae), registraron mayores tasas de esporulaciones a dosis altas y mayor proporción de micelio sobre los Trips adultos muertos en comparación a las larvas.

Tabla 7. Larvas de segundo instar muertas en cámara húmeda.

Género	Cepa	Larvas muertas	Larvas muertas con micelio externo	Larvas muertas con micelio externo en (%)
<i>Penicillium</i>	P321	22	16	72,73
<i>Penicillium</i>	P313	17	6	35,29
<i>Penicillium</i>	P121	22	7	31,82
<i>Penicillium</i>	P129	21	3	14,28
<i>Trichoderma</i>	T323	24	6	25

Fuente: elaboración propia

3.1.4.1.2 Evaluación de Tiempo Letal en Larvas de Segundo Instar. Los valores de tiempo letal medio (TL₅₀), se muestran en la tabla 8. Los valores de TL₅₀ para cada cepa se hallaron por método gráfico a partir de las curvas de mortalidad.

Tabla 8. Valores de TL₅₀ en larvas de segundo instar Trips

Género	Cepa	TL ₅₀ (días)
<i>Penicillium</i>	P321	1,73±0,23 ^a
<i>Penicillium</i>	P313	6,67±0,67 ^{c,d}
<i>Penicillium</i>	P121	3±1,53 ^{a,b,c}
<i>Penicillium</i>	P129	6,27±2,39 ^{b,c,d}
<i>Trichoderma</i>	T311	10±1 ^d
<i>Trichoderma</i>	T323	2,43±0,43 ^{a,b}

Los superíndices a, b, c y d muestran los agrupamientos obtenidos por la prueba de Duncan.

Fuente: elaboración propia

El análisis de varianza (ANOVA) indica que hay diferencias significativas en el TL₅₀ de los hongos sobre las larvas de segundo instar de Trips (p: 0,004) y según la prueba de Duncan se logró diferenciar cuatro grupos, donde se destacan el P321, que registró los menores valores de TL₅₀ durante los bioensayos (grupo a, tabla 8). Mientras que el T311 registró el mayor valor de TL₅₀ en el bioensayo (grupo d, tabla 8).

La cepa *Penicillium sp.* 321 presentó valores menores de TL₅₀ seguida de la cepa *Trichoderma sp.* 323 y *Penicillium sp.* 121, mientras que la cepa *Penicillium sp.* 313 y *Trichoderma sp.* 311 no lograron causar la muerte del 50% de la población de larvas de Trips durante el tiempo del ensayo. Estos resultados son similares a Ge et al., (2020), que evaluaron el TL₅₀ del hongo entomopatógeno *Metarhizium flavoviride* contra larvas de segundo instar de Trips *Frankliniella occidentalis* encontrando que a concentraciones de 1.2x10⁸ conidios/mL se lograba un TL₅₀ de 3,11 días y una mortalidad final de los 10 días de inoculación del hongo del 100% sobre las larvas.

3.1.4.2 Bioensayo 2 Trips Adultos

3.1.4.2.1 Evaluación de Mortalidad en Trips Adultos. En la tabla 9 se muestran los valores de mortalidad en los ensayos de patogenicidad sobre adultos de Trips durante los 9 días del ensayo.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de adultos Trips causado por cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* 9 días después de la inoculación.

Género	Cepa	Concentración conidios/mL	Mortalidad general (%)
<i>Penicillium</i>	P321	2,6 x10 ⁶	76,67±5,77 ^a
<i>Penicillium</i>	P313	2,6 x10 ⁶	76,67±25,17 ^a
<i>Penicillium</i>	P121	2,6 x10 ⁶	60±26,46 ^a
<i>Penicillium</i>	P129	2,6 x10 ⁶	76,67±11,55 ^a
<i>Trichoderma</i>	T311	2,6 x10 ⁶	63,33±11,55 ^a
<i>Trichoderma</i>	T323	2,6 x10 ⁶	60±10 ^a
<i>Trichoderma</i>	T25	2,6 x10 ⁶	50±20 ^a
Testigo		Agua destilada	0 ^b

Los superíndices a y b muestran los agrupamientos obtenidos por la prueba de Duncan. Fuente: elaboración propia

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que hay diferencias estadísticas significativas de todos los tratamientos respecto al testigo, indicando que los hongos de género *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* tienen efecto patogénico sobre los adultos de Trips en las cepas evaluadas (p: 0,001) en la concentración de 2.6 x10⁶ conidios/mL. En la prueba de Duncan se logró diferenciar dos grupos, el grupo b lo conforma el Testigo y el grupo a todos los tratamientos con las cepas evaluadas, donde se observa un efecto similar (Tabla 8). Al final del ensayo, la menor mortalidad se registró en la cepa *Trichoderma sp.* 25 con un 50% y la mayor fue de 76,67% para las cepas *Penicillium sp.* 321, *Penicillium sp.* 313 y *Penicillium sp.* 129.

Los valores de mortalidad obtenidos sobre adultos de Trips bajo condiciones de laboratorio con cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* se encuentran dentro de los rangos de mortalidad encontrados usando hongos entomopatógenos, reconocidos en la literatura por tener efecto patógeno sobre el orden Thysanoptera

(Trips) (Tabla 10). En este estudio los valores de mortalidad estuvieron entre 50-76,67% sobre adultos de Trips, indicando buenos valores de patogenicidad y virulencia. No se encontraron estudios usando cepas de *Penicillium sp.* o *Trichoderma sp.* contra estados adultos de Trips.

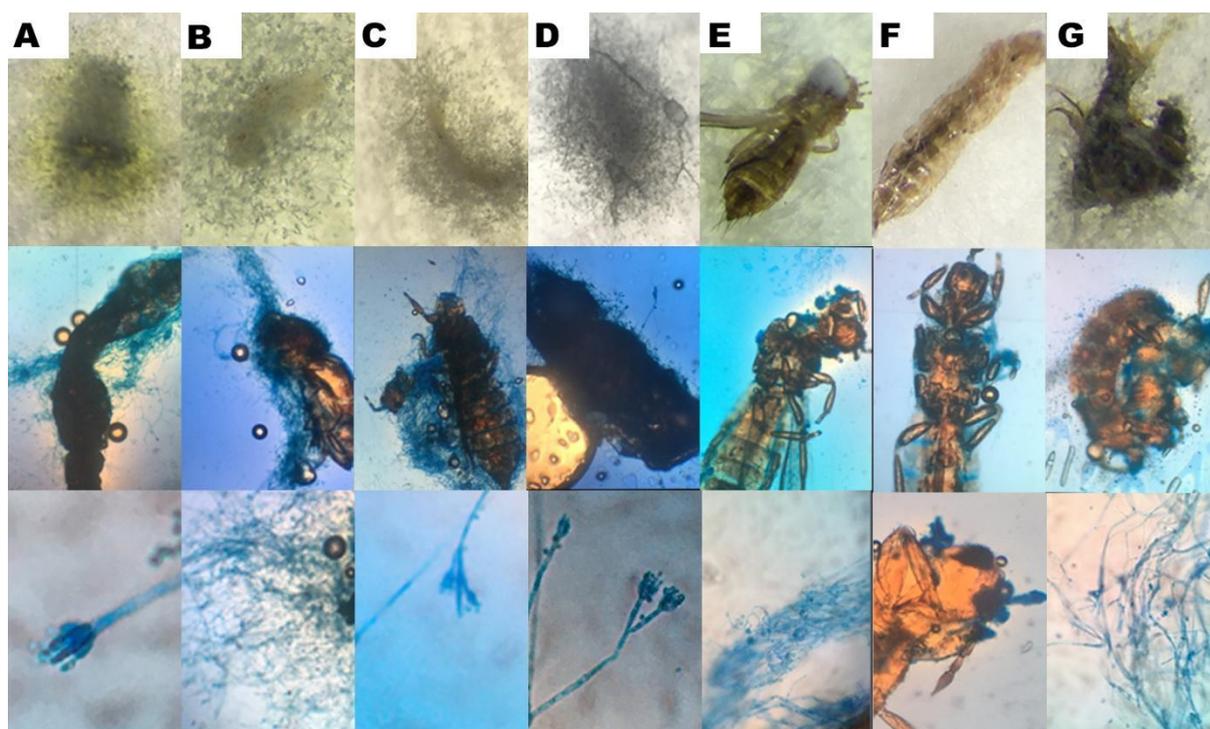
Tabla 10. Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra adultos de Trips.

Autores	Hongo	Inoculo (conidios/mL)	Estadio Trips	Mortalidad (%)
Du et al., (2019)	<i>Akanthomyces sp.</i> <i>Metarhizium flavoviride</i>	$1,9 \times 10^6$ - $1,9 \times 10^8$ inoculación tópica indirecta, una aplicación	Adultos <i>Megalurothrips usitatus</i>	57,5 - 76,25
Zahn y Morse (2013)	<i>Beauveria bassiana</i>	$8,61 \times 10^4$ - $2,2 \times 10^6$ Aspersión, una aplicación	Hembras adultas <i>Scirtothrips citri</i> Moulton <i>Scirtothrips. perseae</i> Nakahara	90-98
Arthurs et al., (2012)	<i>B. bassiana</i> <i>M. brunneum</i> <i>I. fumosorosea</i>	1×10^8 Aspersión Una aplicación	Adultos <i>Scirtothrips dorsalis</i> Hood	100 95 85
Restrepo (2015)	<i>Lecanillium sp.</i> , <i>Metarhizium sp.</i>	$2,18 \times 10^6$ - $2,18 \times 10^8$ Aspersión Una aplicación	Adultos <i>Frankliniella spp</i>	64,86 - 100 70,27 - 100
Este estudio	<i>Penicillium sp.</i>	$2,6 \times 10^6$ Aspersión Una aplicación	Adultos de Trips	60 - 76,67
Este estudio	<i>Trichoderma sp.</i>	$2,6 \times 10^6$ Aspersión Una aplicación	Adultos de Trips	50 - 63,33

Fuente: elaboración propia

En la figura 14 se observa el registro de adultos de Trips que presentaron micelio externo posterior al tratamiento con cámara húmeda. En la columna A se presentan los resultados de *Penicillium sp.* 321, en la columna B de *Penicillium sp.* 313, en la columna C de *Penicillium sp.* 121, en la columna D de *Pencillium sp.* 129, en la E de *Trichoderma sp.* 311, en la columna F de *Trichoderma sp.* 323 y en la columna G *Trichoderma sp.* 25. En cada ensayo al aplicar azul de lactofenol sobre los Trips y llevar al microscopio al objetivo de 10x se observó la presencia de hifas con coloración azul y cuando se aumentó al objetivo de 40x se logró diferenciar las estructuras reproductivas de los hongos.

Figura 14. Registro cámara húmeda adultos de Trips muertos: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol.



Fuente: elaboración propia

A: cepa P321, B: cepa P313, C: cepa P121, D: cepa P129, E: cepa PT311, F: cepa T323 y G: cepa T25

En la tabla 11 se muestra el registro de adultos de Trips muertos que presentaron micelio externo visible con ayuda de estereoscopio en la cámara húmeda. La cepa *Pencillium sp.* 321 presentó la mayor proporción de Trips muertos con desarrollo

de micelio externo con un 82,61% seguido de la cepa *Penicillium sp.* 121 con un 72,22%. Mientras que las otras cepas presentaban menor proporción de micelio externo. Al observar en microscopio con tinción de azul de lactofenol se observó el desarrollo del proceso de infección. Como se discutió anteriormente, el desarrollo de la micosis está relacionada a la capacidad esporulativa de la cepa del hongo y la edad del insecto, en este estudio los adultos de Trips fueron más susceptibles al ataque de los hongos del genero *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* que las larvas registrando mayores valores de mortalidad y proporción de micelio externo en los insectos muertos durante el proceso en cámara húmeda.

Tabla 11. Adultos de Trips muertos en cámara húmeda.

Género	Cepa	Adultos de Trips muertos	Adultos de Trips muertos con micelio externo	Adultos de Trips muertos con micelio externo en (%)
<i>Penicillium</i>	P321	23	19	82,61
<i>Penicillium</i>	P313	22	7	31,82
<i>Penicillium</i>	P121	18	13	72,22
<i>Penicillium</i>	P129	23	13	56,52
<i>Trichoderma</i>	T311	21	7	38,33
<i>Trichoderma</i>	T323	18	9	50
<i>Trichoderma</i>	T25	29	11	55

Fuente: elaboración propia

El proceso de infección también depende de la cepa, en este estudio al observar los insectos muertos que no se observaba esporulación externa pero con ayuda del microscopio y tinción de azul de lactofenol si se observa el proceso de infección, indicando un posible retraso en su actividad dentro de la estructura del insecto como sugiere, Zahn, D. y Morse, J. (2013) que evaluaron el proceso de infección de *Beauveria bassiana* contra adultos de Trips de los cítricos y Trips del aguacate (Thysanoptera: Thripidae), donde los insectos que no mostraban micelio se sembraron en medio agar PDA durante 5 días en incubación para ser reexaminados observando que mostraban desarrollo de micelio luego de activarse en el medio agar, determinando que la actividad de infección mostraba un posible retraso.

Los síntomas de infección se refieren al desarrollo del hongo sobre el insecto, en este estudio los adultos de Trips muertos desarrollaron diferentes síntomas de infección que variaban de acuerdo a cada cepa, encontrando que a los 8 días en cámara húmeda en algunos adultos muertos las hifas cubrían todo el cuerpo del insecto o solamente ciertas partes como la cabeza o el recto, cavidades por donde el hongo hace su proceso de penetración sobre el insecto, lo cual nos sugiere diferentes niveles de retraso del crecimiento micelial relacionado a sus actividades patogénicas y su capacidad de esporulación. Este proceso de infección fue más largo en comparación a Du et al., (2019) quien registró el proceso de infección en medios de cultivo con insectos adultos de *Megalurothrips usitatus* (Thysanoptera: Thripidae) muertos por acción de cepas de *Akanthomyces attenuatus*, encontrando que las hifas se empezaban a producir alrededor de las cavidades del recto del insecto y luego cubrían todo el cadáver alrededor de 5 días. Igualmente, Restrepo (2015) evaluó la capacidad de esporulación de *Lecanicillium sp.* y *Metarhizium sp.* sobre adultos muertos de *Frankliniella spp.*, en cámara húmeda donde se registró la producción de micelio, para *Lecanicillium sp.* se observó la emergencia al día 2 del hongo hasta lograr cubrir todo el insecto muerto. Mientras que *Metarhizium sp.* el micelio emergió en pocas cantidades alrededor del día 4, indicando que hay diferencias en la capacidad de esporulación entre las cepas.

3.1.4.2.2 Evaluación de Tiempo Letal en Trips Adultos. Los valores de tiempo letal medio (TL₅₀) sobre adultos de Trips, se muestran en la tabla 12. Los valores de TL₅₀ para cada cepa se hallaron por método gráfico a partir de las curvas de mortalidad.

Tabla 12. Valores de TL₅₀ en adultos de Trips.

Genero	Cepa	TL ₅₀ (días)
<i>Penicillium</i>	P321	4,67±2,08 ^a
<i>Penicillium</i>	P313	4,01±1,73 ^a
<i>Penicillium</i>	P121	6,17±2,75 ^a
<i>Penicillium</i>	P129	5,53±2,25 ^a
<i>Trichoderma</i>	T311	6,1±2,59 ^a
<i>Trichoderma</i>	T323	7,03±0,7 ^a
<i>Trichoderma</i>	T25	6,42±4,91 ^a

Fuente: elaboración propia

El análisis de varianza (ANOVA) indica que no hay diferencias significativas entre los valores de TL₅₀ para cada cepa (p: 0,797). Sin embargo, la cepa *Penicillium sp.* 313 registró menores valores de TL₅₀, mientras que *Trichoderma sp.* 323 presentó el TL₅₀ más alto. Estos valores son similares a los que se encuentran reportados usando hongos entomopatógenos contra adultos de Trips como se resume en la tabla 13.

Tabla 13. Valores de TL₅₀ referenciados usando hongos entomopatógenos adultos de Trips.

Autores	Hongo	Inoculo (conidios/mL)	Estadio Trips	TL₅₀ (días)	Mortalidad final (%)
Ge et al., (2020)	<i>Metarhizium flavoviride</i>	1,2x10 ⁶ Inmersión, una aplicación	Adultos <i>Frankliniella occidentalis</i>	4,94	75
Zhang et al., (2021)	<i>Beauveria bassiana</i>	1x10 ⁸ Aspersión, una aplicación	Adultos <i>Frankliniella occidentalis</i>	3,75±0,63	81,48
Restrepo (2015)	<i>Lecanillium sp.</i> <i>Metarhizium sp.</i>	2,18x10 ⁶ inoculación tópica indirecta, una aplicación	Adultos <i>Frankliniella occidentalis</i>	4,5-5 5-5,2	64,86- 70,27 70,27- 72,22
Du et al., (2019)	<i>Akanthomyces sp.</i>	1x10 ⁸ inoculación tópica indirecta, una aplicación	Adultos <i>Megalurothrips usitatus</i>	3,5-4,9	76,25
Este estudio	<i>Penicillium sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Adultos de Trips	4,01-6,17	60 - 76,67
Este estudio	<i>Trichoderma sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Adultos de Trips	6,1-7,03	50 - 63,33

Fuente: elaboración propia

Como se mencionó anteriormente, no se encuentran estudios usando cepas de *Penicillium sp.* o *Trichoderma sp.* contra adultos de Trips. Por otro lado, se

destacan estudios donde aíslan cepas de *Penicillium sp.* de Trips muertos, encontrando que el 20,29% de los hongos aislados pertenecían a ese género, generalmente considerados saprofitos, sin embargo, este género puede llamar la atención al ser aislados del insecto y deben estudiarse como potenciales agentes de control biológico sugiriendo especificidad sobre el Trips (Restrepo, 2015).

3.1.4.3 Bioensayo 3 Evaluación de Mortalidad en Pupas

En la tabla 14. se muestran los valores de mortalidad sobre pupas de Trips durante los 9 días del ensayo. La mortalidad fluctuó entre 3,33 a 13,33% entre las cepas.

Tabla 14. Porcentaje de mortalidad general y mortalidad corregida de Pupas de Trips causado por cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* 9 días después de la inoculación.

Género	Cepa	Concentración conidios/mL	Mortalidad general (%)
<i>Penicillium</i>	P321	2,6x10 ⁶	6,67±5,77
<i>Penicillium</i>	P313	2,6x10 ⁶	13,33±5,77
<i>Penicillium</i>	P121	2,6x10 ⁶	6,67±11,55
<i>Penicillium</i>	P129	2,6x10 ⁶	3,33±5,77
<i>Trichoderma</i>	T311	2,6x10 ⁶	6,67±5,77
<i>Trichoderma</i>	T323	2,6x10 ⁶	10±10
<i>Trichoderma</i>	T25	2,6x10 ⁶	6,67±5,77
Testigo		Agua destilada	0±0

Fuente: elaboración propia

Se obtuvieron valores de mortalidad bajos y de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) no hay diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (p: 0,496), indicando que no hubo patogenicidad de las cepas contra el estadio pupal del Trips. Por otro lado, se encuentran diferentes resultados en mortalidad sobre pupas usando hongos entomopatógenos como se resume en la tabla 15. Aunque los resultados en laboratorio usando cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* no muestran efectos patogénicos, son pocos los estudios reportados bajo condiciones de laboratorio sobre estados pupales del Trips con diferentes metodologías y resultados entre sí (Ansari, Brownbridge, Shah, & Butt, 2008; Ekesi & Maniania,

2000) sin resultados concluyentes ya que los estudios se han concentrado sobre los demás estadios del Trips (Tabla 15).

Tabla 15. Estudios referenciados usando hongos entomopatógenos contra pupas de Trips.

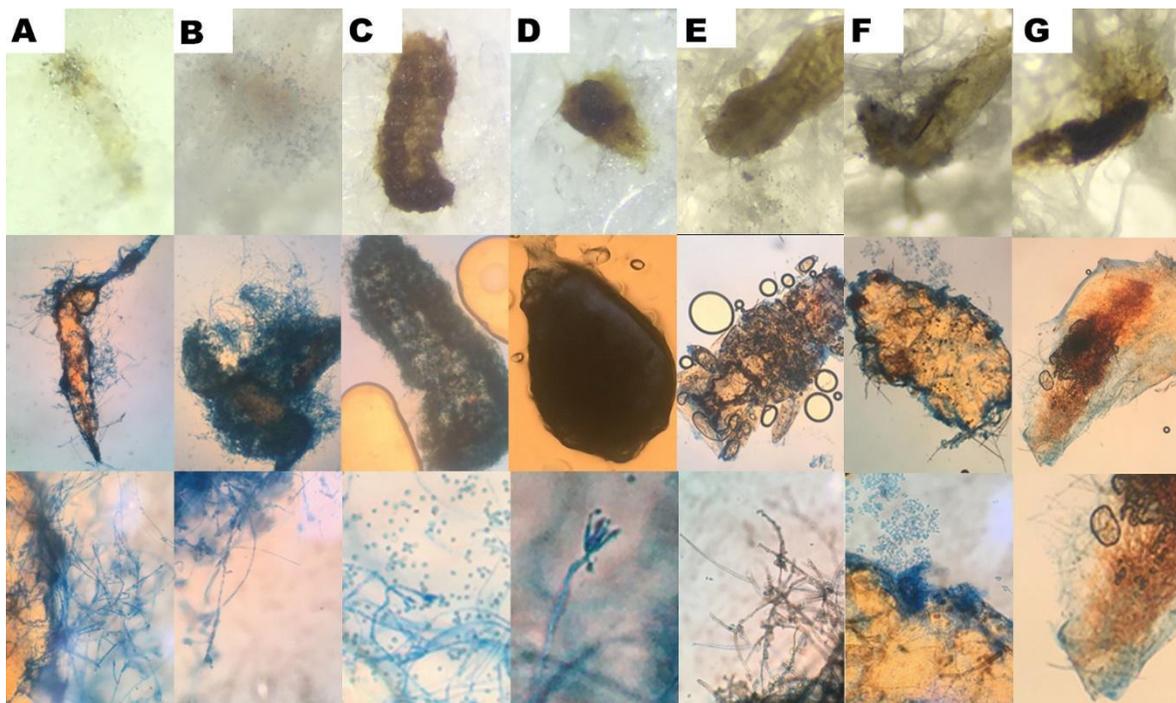
Autores	Hongo	Inoculo (conidios/m)	Estadio Trips	Sustrato de pupación	Mortalidad (%)
Ansari et al., (2008)	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Metarhizium flavoviridae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoreus</i>	1x10 ¹⁰ Inoculación tópica indirecta en media de cultivo, una aplicación	Estadios pupales <i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande	Turba, fibra de coco, corcho y turba mezclados con un 10 a 20% de residuos verdes compostados	53 - 96 50 - 75 54 - 84 63 - 75
Ekesi, S. y Maniania, N.K. (2000)	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1x10 ⁸ 1x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Pupas <i>Megalurothrips sjostedti</i>	-	45,6 20,5
Este estudio	<i>Penicillium sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Estadios pupales de Trips	Papel filtro	3,33 - 13,33
Este estudio	<i>Trichoderma sp.</i>	2,6x10 ⁶ Aspersión, una aplicación	Estadios pupales de Trips	Papel filtro	6,67 - 10

Es importante entender la biología del Trips, y su comportamiento durante el estado pupal. Skinner, M et al., (2012) referencia varios estudios indicando que normalmente la pupación de Trips ocurre en el suelo, sin embargo, esto puede depender de la especie de la planta en la que se alimenta, etapa de desarrollo de la planta (estado de floración) y niveles de humedad dentro del entorno de la planta donde se alimenta, por ejemplo menciona el autor que el 90% de Trips en plantas de crisantemos sin floración se dejan caer de la planta y desarrollan la pupación en el suelo mientras que el 60% de Trips puparon dentro de la estructura

floral del crisantemo mientras las plantas estaban florecidas. Skinner, M et al., (2012) también concluye que se han hecho pocos ensayos bajo laboratorio con hongos entomopatógenos contra el estadio pupal usando aplicaciones foliares o rociando los medios de crecimiento de la planta, con resultados inconsistentes, siendo necesario evaluar diferentes medios de crecimiento, dosis y métodos de aplicación y registrar la humedad y temperatura en las estructuras de la planta, para profundizar más el conocimiento sobre el comportamiento del estadio pupal del Trips antes de llevar a evaluaciones en campo.

En la figura 15 se observa el registro de pupas que presentaron micelio externo luego del tratamiento con cámara húmeda. En la columna A se presentan los resultados de *Penicillium sp.* 321, en la columna B de *Penicillium sp.* 313, en la columna C de *Penicillium sp.* 121, en la columna D de *Pencillium sp.* 129, en la E de *Trichoderma sp.* 311, en la columna F de *Trichoderma sp.* 323 y en la columna G *Trichoderma sp.* 25. En cada ensayo al aplicar azul de lactofenol sobre los Trips y llevar al microscopio al objetivo de 10x se observó la presencia de hifas con coloración azul y cuando se aumentó al objetivo de 40x se logró diferenciar las estructuras reproductivas de los hongos.

Figura 15. Registro cámara húmeda de pupas de Trips muertas: observaciones de micelio externo usando estereoscopio y tinción de lactofenol registro infección hongo.



Fuente: elaboración propia

A: cepa P321, B: cepa P313, C: cepa P121, D: cepa P129, E: cepa PT311, F: cepa T323 y G: cepa T25

Actualmente el Trips *Frankliniella occidentalis* presenta resistencia a muchos insecticidas (Dong-Gang et al., 2016; Jessica M Kivett et al., 2015; Restrepo, 2015) y últimamente se resalta la necesidad de evaluar y desarrollar nuevos agentes de control biológico, como son los hongos entomopatógenos. Considerando que el Trips en su estructura no presenta actividad inhibitoria contra algunos hongos entomopatógenos, como demuestra Golebiowski, M. et al., (2007) quienes estudiaron la composición lipídica cuticular de *F. occidentalis*, estos lípidos epicuticulares se encargan de proporcionar una barrera pasiva primaria reduciendo la entrada de sustancias químicas y/o toxinas, donde los autores aclaran que la composición química de los lípidos epicuticulares es solo uno de los factores que pueden estar relacionados a la resistencia a insecticidas o agentes de control, en el estudio solo se identificaron dos grupos de compuestos en los lípidos cuticulares de adultos y larvas de *F. occidentalis*: hidrocarburos y ácidos grasos libres. Se confirmó la falta de inhibidores potenciales de hongos entomopatógenos, referenciando que la actividad inhibitoria de los ácidos grasos encontrados también se había evaluado frente al hongo *Paecilomyces fumosoroseus* sin indicar actividad inhibitoria, como también al estar presente en otros insectos estos tampoco reducen las tasas de germinación de hongos entomopatógenos. Además, no se encontraron esteres de cadena larga en la estructura del Trips que inhiben el crecimiento de hongos entomopatógenos comunes como *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus*.

En este estudio, en general, las cepas de *Penicillium sp.* y *Thricoderma sp.* muestran potencial entomopatogenico contra diferentes estadios de Trips especialmente para larvas y adultos. Sin embargo, se resalta que los adultos fueron más susceptibles de infección que las larvas y las pupas, especialmente en las cepas de *Penicillium sp.* que mostraron valores más constantes de mortalidad en los bioensayos sobre larvas y adultos de Trips. Esto concuerda con los resultados de Arthurs et al., (2012) donde encontraba que en *Scirtothrips dorsalis*, que afecta cultivos ornamentales, los adultos eran más susceptibles que las larvas a la infección de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum* e *Isaria fumosorosea* al igual que encontraban que los Trips adultos presentaban tasas mayores de esporulaciones y signos de micosis que las larvas muertas, esto se debe a que durante las etapas larvarias se van generando cambios constantes a nivel de la cutícula durante el desarrollo de los estadios, este proceso se denomina ecdisis, el

cual es el cambio periódico de la cutícula del exoesqueleto durante el desarrollo del individuo, considerado un factor de resistencia de los insectos a la infección fúngica, especialmente cuando el intervalo entre ecdisis sucesivas es corto, como en el caso del Trips durante las etapas larvianas. Como también sugiere Ugine et al., (2005) quienes indicaron en su estudio que la susceptibilidad al ataque entomopatógenos se relacionaba a la edad de las larvas de segundo instar de Trips *Frankliniella occidentalis*, las larvas a medida que se aproximaban al estadio de pre-pupa se volvían menos susceptibles de micosis de *B. bassiana*, debido a que va generando cambios a nivel de la cutícula que redujo significativamente el efecto de mortalidad, obteniendo mortalidades inferiores al 20% al realizar aplicaciones del hongo en etapas más tardías de larvas de segundo instar. Similar a Ekesi & Maniania (2000) quienes observaron que los estados de pupas y larvas fueron menos susceptibles a la infección de *Metarhizium anisopliae* que los adultos de Trips, considerando la relación de la interacción de la capa externa del insecto (tegumento) con el hongo y el proceso denominado ecdisis.

Dentro del modo de acción de infección del hongo entomopatógenos, la penetración implica procesos físicos y químicos mediante el avance de las hifas y la secreción de enzimas como proteasas, lipasas, quitinasas que facilitan el proceso de infección. La actividad enzimática es considerada un buen parámetro para la selección de potenciales agentes de control biológico. En este estudio el mayor registro de mortalidad se encontró en la cepa de *Thricoderma* T323 sobre larvas de segundo instar y de acuerdo a González et al., (2010) algunos aislamientos de *Trichoderma* sp. pueden producir enzimas hidrolíticas en diferentes niveles influyendo sobre la capacidad antagónica de las cepas, encontrando diferentes niveles de actividad enzimática quitinasa entre los aislamientos, lo que concuerda al encontrar diferentes niveles de mortalidad respecto a las otras cepas de *Thricoderma* sp. (T311, T323 y T25). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las quitinasas no son las únicas enzimas involucradas en el proceso de infección, también se encuentran enzimas hidrolíticas como las amilasas, las proteasas, las lipasas, las esterases, las glucanasas y las catalasas. Gharsallah et al., (2020) en su estudio de caracterización y potencial de control biológico de aislado fúngicos, encuentra que cepas del género *Penicillium* sp. se destaca como un buen productor de amilasas y de lipasas. Las lipasas están involucradas en la adhesión de esporas a la cutícula del huésped mientras que las amilasas encargadas de la degradación de glicógeno del tejido del insecto para el crecimiento y la invasión. En este mismo estudio referenciado, Gharsallah et al., (2020) realiza un ensayo de actividad entomopatógena sobre larvas de *Ephestia kuehniella*, cuyas larvas se utilizan ampliamente como huésped para ensayos de

agentes de control biológico (Kurtulus, Pehlivan, Achiri, & Atakan, 2020) encontrando valores de mortalidad para las cepas estudiadas de *Penicillium* sp. entre 25-55%. En nuestro estudio las cepas de *Penicillium* sp. P321, P121 y P129 muestran niveles de mortalidad mayores al 60% sobre larvas y adultos de Trips.

Además del potencial de producción de enzimas como factor de virulencia que permiten un avance eficaz de las hifas a través de la cutícula del insecto por parte del hongo Corallo (2016) sugiere que el éxito en la utilización de hongos entomopatógeno depende entre otras factores como la patogenicidad y la capacidad esporulativa de la cepa (Restrepo, 2015) es decir que garanticen un proceso de micosis, como se refleja en las pruebas en cámara humedad bajo condiciones saturadas para confirmar la muerte del insecto por acción del hongo y para observar el desarrollo de los hongos sobre la superficie del cadáver de los insectos. La prueba en cámara húmeda permite satisfacer los postulados de Koch, para validar la acción de un microorganismo sobre los individuos (Gharsallah et al., 2020). Como sugieren los resultados *Penicillium* sp. 321 registró valores altos de mortalidad en adultos (76,67%) y larvas de segundo instar de Trips (66,66%) además de presentar mayores valores de proporción de micelio externo en cámara húmeda sobre individuos muertos de larvas (72,73%) y adultos (82,61%) que las otras cepas que mostraron variación de mortalidad entre los tratamientos y menores tasas de esporulación sobre los estadios muertos. Por tanto, la cepa *Penicillium* sp. 321 fue escogida para ensayos en invernadero, donde se evaluó de manera preliminar si presentaba fitotoxicidad sobre plantas de crisantemo.

3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS HONGOS SELECCIONADOS PARA EL CONTROL DE TRIPS MEDIANTE CONDICIONES DE INVERNADERO

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de evaluación de actividad biocontroladora de Trips en condiciones de invernadero. Se escogió la cepa P321 que mostró los mejores resultados en la fase de laboratorio y fue llevada a evaluación en plantas de crisantemo para evaluar la actividad biocontroladora para el control de Trips. Inicialmente se realizó un ensayo de fitotoxicidad para confirmar su viabilidad sobre plantas de crisantemo y con este ensayo se estableció una escala de calidad en experimentos enjaulados.

3.2.1 Ensayo de Fitotoxicidad

No se observó fitotoxicidad mediante inspección visual con el tratamiento de la cepa P321 sobre plantas de crisantemo florecidas en las condiciones del ensayo (Figura 16).

Figura 16. Flores de crisantemo amarillo y blanco sin daño en el ensayo de fitotoxicidad.



3.2.2 Evaluación de la Capacidad Biocontroladora

3.2.2.1 Conteo de Trips en Condiciones de Invernadero. Los registros del conteo de Trips en los tratamientos son presentados en la figura 17 y 18. El análisis de varianza de medidas repetidas entre los tratamientos y las semanas del ensayo, mostró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p: 0,596$), sin embargo, entre las semanas de muestreo indica que existen diferencias significativas ($p: 0,004$) con respecto a la semana 3, semana en la cual se observa un incremento del conteo promedio de Trips en los tratamientos T1, T3 y T4 respecto a T2 que es el tratamiento con la cepa de hongo entomopatógeno comercial *Beauveria bassiana* (ADRAL®s.c.) que presentó menos valores en el conteo de Trips. El ciclo biológico del Trips en este estudio fue analizado bajo condiciones de laboratorio y teniendo en cuenta que desde la eclosión de los huevos hasta llegar a fase adulta puede tomar aproximadamente 21 días, este incremento en el conteo de Trips está relacionado con los individuos desarrollados en las plantas bajo condiciones de invernadero. Teniendo en cuenta la biología del Trips *Frankliniella occidentalis*, como plaga importante de cultivos ornamentales y polífaga de cultivos de hortalizas y frutales, debido a su alta fecundidad, cuyas hembras también se pueden reproducir sin la necesidad de reproducción sexual con un macho realizando un proceso denominado partenogénesis, dando descendencias hembras. Cardenas y Corredor (1989) en su estudio sobre la biología de esta especie, encontraron que bajo condiciones de laboratorio los

adultos pueden tener una longevidad en promedio de 91,26 días, y las hembras pueden tener un promedio de 3,19 huevos por hembra por día.

Figura 17. Conteo promedio de Trips con ayuda de cintas adhesiva en experimentos enjaulados (T1: Biológico silvestre *Penicillium sp.* 321, T2: Biológico comercial *Beauveria bassiana*, T3: Químico insecticida CAZADOR® y T4: Control plantas con infestación de Trips).

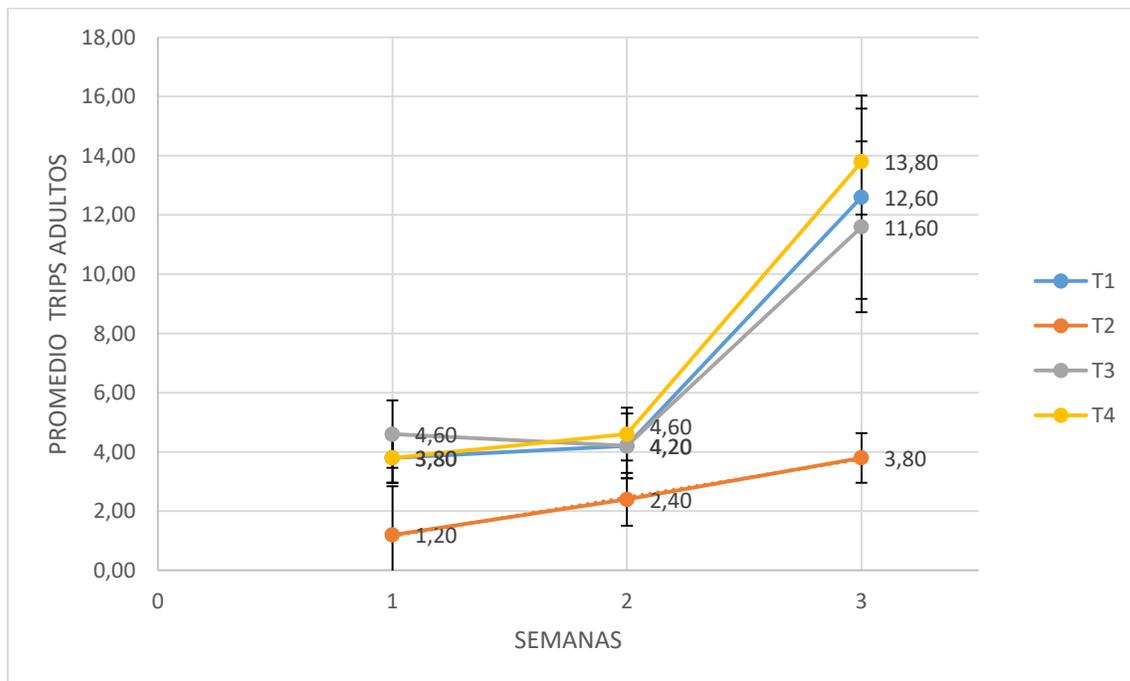
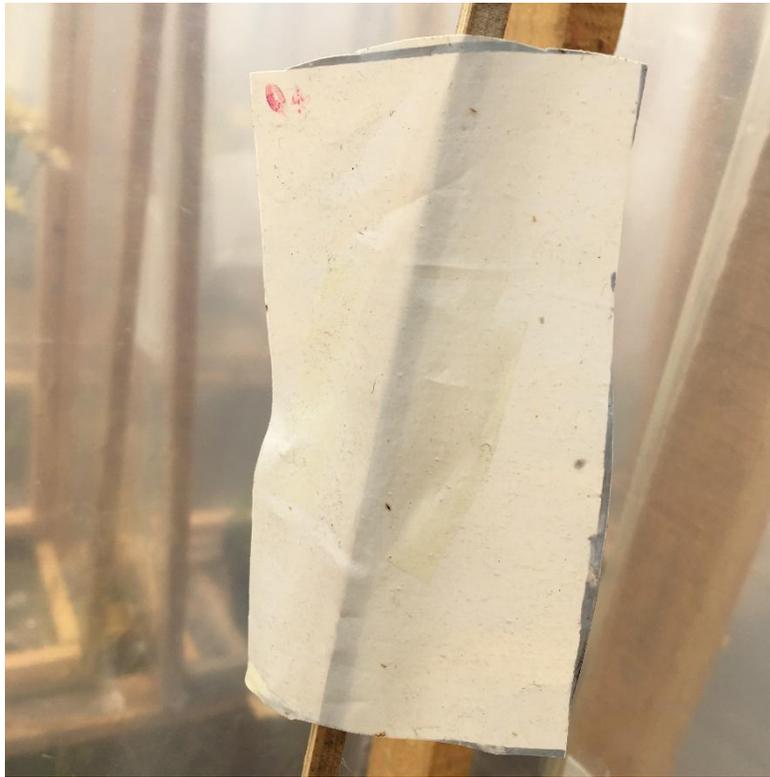


Figura 18. Cinta adhesiva blanca para el registro de Trips.



Los tratamientos T1 (cepa *Penicillium* sp. 321) y T3 (Tratamiento químico CAZADOR® fipronil) muestran igual comportamiento que T4 (tratamiento control infestación Trips) en cuanto al conteo de Trips en las 3 semanas, aumentando los valores en relación al tiempo, indicando poca o nula efectividad de los ensayos respecto al control. En cuanto al tratamiento químico, se aplicó una sola vez el producto CAZADOR® cuyo componente activo es fipronil, el cual se recomienda para el control de Trips y actúa por ingestión y contacto. El tratamiento químico muestra un similar comportamiento al observado por Bustillo, A. (2009) quien evaluó la aplicación de diferentes insecticidas para evaluar el control de *Frankliniella occidentalis* en un cultivo de espárragos, incluyendo un producto denominado REGENT® (fipronil) (dosis/tratamiento 9,6 c.c) encontrando que reducía niveles de Trips a los dos días de aspersión, sin embargo al quinto día no se observaba ningún efecto y no hubo diferencias con el testigo, con el mismo comportamiento para el resto de los insecticidas evaluados. El autor aclara que se siguieron las indicaciones de la etiqueta sugiriendo nuevos ensayos con dosis más altas, además afirma que esta plaga requiere aplicaciones frecuentes para reducir poblaciones. Como ocurre en la región, productores de flores realizan varias aplicaciones con insecticidas para reducir niveles de Trips, especialmente antes

del desarrollo de la flor como medida preventiva pero también durante la floración como medida correctiva. Esta última no es recomendada, considerando la resistencia a plaguicidas del Trips. Gao, Lei, & Reitz, (2012) referencia la Base de Datos Resistencia de plaguicidas (The Arthropod Pesticide Resistance Database) mantenida por la universidad estatal de Michigan (www.pesticideresistance.org), que registra casos documentados de resistencia a insecticidas contra artrópodos. El género Thysanoptera registra 329 casos, donde el 53% de los casos para *Frankliniella occidentalis* y el 31% para *Thrips tabaci*, especies de importancia en cultivos ornamentales. Estos casos de resistencia involucran insecticidas en al menos siete de las clases químicas actualmente reconocidas por el Comité de Acción de Resistencia a los Insecticidas (IRAC). *Frankliniella occidentalis* presenta resistencia al ingrediente activo fipronil desde 2005.

En cuanto a la eficacia del tratamiento con la cepa *Pencillium sp.* 321 en condiciones de invernadero en ensayos controlados en jaulas sobre plantas de crisantemos, aunque se aplicaron cuatro veces durante cuatro semanas, no reflejan una reducción en el conteo de Trips con las cintas adhesivas, contrario a los resultados en laboratorio. Similar a Kivett, Cloyd, y Bello (2016) donde las condiciones en laboratorio favorecieron la infección de los hongos entomopatógenos sobre las larvas y adultos de Trips *Frankliniella occidentalis*, creando un escenario óptimo, donde se resalta la importancia de las pruebas en laboratorio, los autores sugieren que se debe seguir trabajando con diferentes dosis y diferentes formulaciones contra los estadios de Trips y realizar otras pruebas preliminares de evolución entomopatógenos en conjunto e igualmente en condiciones de invernadero controlando las condiciones de temperatura y humedad antes de pasar a pruebas en campo.

En el tratamiento T2, usando la cepa comercial *Beauveria Bassiana* (ADRAL@s.c.) que registró menores valores de Trips en el conteo con ayuda de las cintas adhesivas y aunque se limitó por la duración del ensayo relacionada a la duración de la floración de la planta, muestra una línea de tendencia de crecimiento de niveles de Trips, que sugieren la necesidad de apoyarse en programas de rotación dentro del manejo integrado de plagas.

3.2.2.2 Determinación de la Calidad de Plantas. Respecto a la evaluación de calidad de las plantas con ayuda de la tabla 2 para recolectar información del estado de las plantas respecto al follaje y las flores los resultados de calidad con la escala de daño se muestran en la figura 19 y son presentadas con registro fotográfico en la figura 20. Se muestra la calificación estimada de la calidad de las plantas para cada tratamiento de acuerdo a la escala establecida de calidad de 1 a

5, siendo 1= no daño visible (ningún daño, efecto, apariencia similar al testigo), 2=1 al 25% daño (Daño leve, leve clorosis y retardo en el crecimiento), 3=26 al 50% de daño (daño moderado, clorosis intensa, necrosis y malformaciones pronunciadas pero el cultivo se recupera), 4=51 al 75% de daño (síntomas marcados, cultivo no se desarrolla bien) y 5=>75% daño. (severo daño, pérdida de plantas, muerte total).

Figura 19. Calificación estimada de la calidad de las plantas para cada tratamiento (T1: Biológico silvestre *Penicillium* sp. 321, T2: Biológico comercial *Beauveria bassiana*, T3: Químico insecticida CAZADOR®, T4: Control plantas con infestación de Trips, T5: Control: Plantas con aplicación de biológico silvestre *Penicillium* sp. 321 y T6: Control: plantas sin aplicación productos biológicos y químicos y sin infestación con Trips).

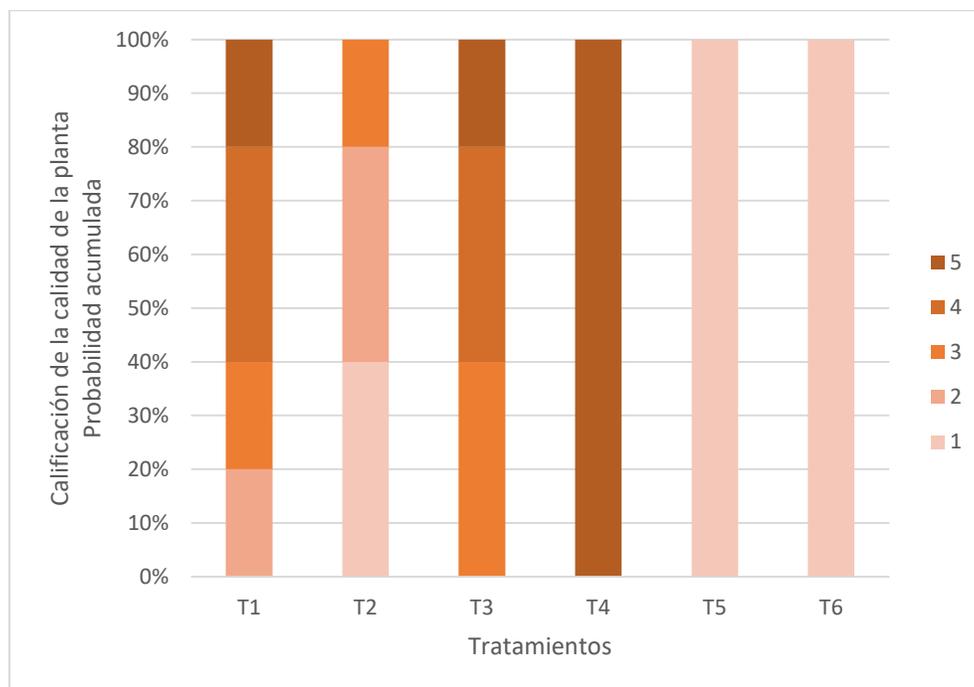
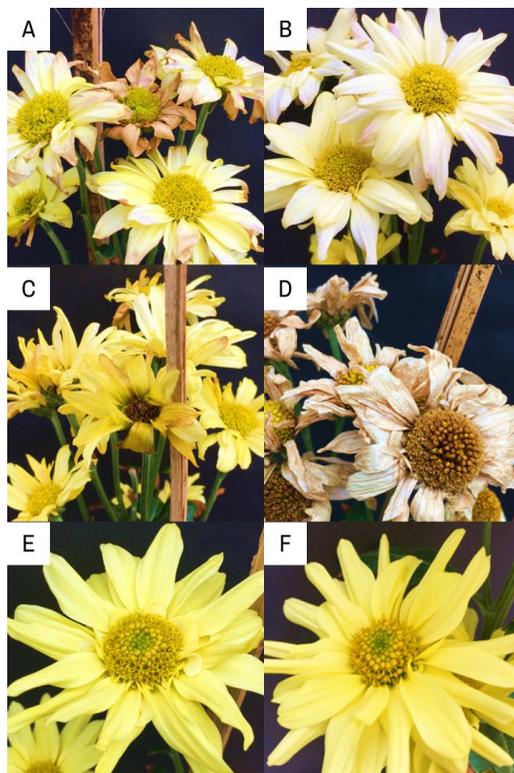


Figura 20. Registro fotográfico calidad de las flores para cada tratamiento al final del ensayo.



A: T1 Biológico silvestre *Penicillium* sp. 321, B: T2 Biológico comercial *Beauveria bassiana*, C: T3 Químico insecticida CAZADOR®, D: T4 Control plantas con infestación de Trips, E: T5 Control plantas con aplicación de biológico silvestre *Penicillium* sp. 321 y F: T6 Control: plantas sin aplicación productos biológicos y químicos y sin infestación con Trips).

El análisis de varianza (ANOVA) indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la evaluación de calidad de las plantas de crisantemo ($p: 0,000$). La prueba de Tukey mostró dos agrupamientos, los tratamientos T2, T5 y T6 se agrupan en el grupo a, donde T2 muestra similitud en la evaluación de calidad en los tratamientos control donde no se realizó infestación de Trips. Mientras que los tratamientos T1, T3 y T4 presentan similitud en la evaluación de calidad o nivel de daño agrupados en el grupo b.

El tratamiento T4 (tratamiento control infestación Trips) presentó el mayor índice de daño de acuerdo a la evaluación de calidad de las flores, severo daño y pérdida de flores debido a la intensidad de la infestación. Mientras que T1 (Formulación cepa P321) y T3 (Tratamiento químico CAZADOR® fipronil) mostraron diferencias

en la medición de calidad de las plantas al final del ensayo. Similar a Kivett (2015) quien también encontró diferencias numéricas en cuanto a la evaluación de calidad de las plantas, la autora sugiere que las evaluaciones de calidad o nivel de daño basadas en observaciones visuales están sujetas a la subjetividad del evaluador. Kivett (2015) propone que plantas con una calificación de calidad del follaje de 1 o 2 pueden ser consideradas por un productor de invernadero como un producto comercializable. Según las calificaciones de calidad de las plantas en los tratamientos con infestación de Trips (T1, T2, T3 y T4), solo el 25% tienen calidad comercializable, encontrando que no es posible mantener una calidad de las plantas incluso en presencia de poblaciones de Trips a diferencia de Kivett (2015) donde se encontró que entre el 60 a 80% de las plantas infestadas con Trips mantuvieron una calidad entre 1 o 2 en la escala teniendo en cuenta que en su estudio se realizaron rotaciones de productos reconocidos de control biológico e insecticidas. Sin embargo, en nuestro estudio el tratamiento T1 con la aplicación de la cepa de *Penicillium sp.* 321 el 20% muestra calidad comerciable contrario al tratamiento químico donde no hay ninguna planta con valor comerciable, sugiriendo un efecto del hongo en mantener la calidad de las plantas influyendo en la actividad alimenticia del Trips sobre las plantas de crisantemo y donde se recomienda evaluar a diferentes formulaciones y condiciones.

Este estudio permite resaltar la importancia de evaluar el potencial entomopatogenico de diferentes cepas de hongos de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* frente al Trips, una importante plaga de cultivo ornamentales, además de que no se encontraron estudios que usen estos dos géneros contra Trips de cultivos ornamentales. Esta investigación se alinea a la tendencia mundial de conseguir "flores limpias", que implica mantener cultivos libres de plagas y enfermedades, así como de reducir y limitar el uso de agroquímicos para la supresión de plagas en cultivos ornamentales que generan problemas ambientales y de salud a las personas, con el fin mantener la calidad de las flores colombianas y su reconocimiento en el mercado internacional. En este estudio se destaca la cepa *Penicillium sp.* 321 que mostró buenos resultados frente a diferentes estadios de Trips bajo condiciones de laboratorio, además de que en los ensayos en invernadero por un lado no muestra riesgo de aplicación en plantas de crisantemo en los ensayos de fitotoxicidad y por otro lado, aunque no logró reducir las poblaciones de Trips en los experimentos enjaulados, en la evaluación de calidad de flores y follaje de plantas de crisantemo, los resultados sugieren que es una cepa promisoría para reducir niveles de daño por Trips en ornamentales.

4. CONCLUSIONES

Se encontró efecto antagónico de cepas de hongos de 7 cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* presentes en la colección del grupo ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca frente a estadios de larvas de segundo instar y adultos de Trips bajo condiciones de laboratorio, siendo más eficiente sobre adultos de Trips.

No se encontró efecto antagónico de las cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* frente a pupas de Trips en este estudio.

Los resultados de mortalidad y evaluación de micosis en cámara húmeda demuestran que los adultos de Trips fueron más susceptibles a la infección de los hongos que las larvas y las pupas bajo una única aplicación.

La cepa *Penicillium sp.* 321 registró mayores resultados de mortalidad en larvas y adultos y mostró mayores signos de micosis sobre los individuos muertos que las otras cepas que confirman su acción patogénica bajo condiciones de laboratorio.

Se encontró un efecto en la actividad biocontroladora de los Trips bajo condiciones de invernadero con el tratamiento con la cepa *Penicillium sp.* 321, 20% de las plantas presentaban calidad comercializable superior a la evaluación de calidad en el tratamiento químico.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar realizando diferentes ensayos en laboratorio con cepas de *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.* frente a estadios de Trips, donde se evalúen a diferentes dosis para determinar la dosis letal media (DL₅₀) y metodologías de aplicación.

Es importante realizar una identificación taxonómica de insectos de Trips presentes en cultivos ornamentales en la región, para confirmar su identidad y discutir su susceptibilidad a hongos entomopatógenos.

En futuras investigaciones bajo condiciones de invernadero se recomienda medir variables como temperatura, humedad y luz que puedan influir en el comportamiento del Trips.

Se recomienda ajustar una formulación con la cepa *Penicillium sp.* 321 para evaluaciones bajo condiciones de invernadero para el control de Trips.

6. BIBLIOGRAFIA

- Albuquerque, E., & Albuquerque, E. (2009). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (homoptera: aleyrodidae). *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 5(6), 209–242. Retrieved from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25735/1/Maranhao.pdf>
- Ansari, M. A., Brownbridge, M., Shah, F. A., & Butt, T. M. (2008). Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in plant-growing media. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 127, 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00674.x>
- Araujo, E., & Henrique, E. (2009). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (homoptera: aleyrodidae). *Anais Da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 5(6), 209–242.
- Arévalo, E., Quintero, O., & Guillermo, C. (2003). Reconocimiento de trips (Insecta: Thysanoptera) en floricultivos de tres corregimientos del municipio de Medellín, Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), 169–175. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v29n2/v29n2a09.pdf>
- Arias, J., & Perez, A. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá* (Pontificia Universidad Javeriana). Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8230/tesis223.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Arthurs, S. P., Aristizábal, L. F., & Avery, P. B. (n.d.). *Evaluation of entomopathogenic fungi against chilli thrips, Scirtothrips dorsalis*. 13(31), 1–16.
- Arthurs, S. P., Aristizábal, L. F., & Avery, P. B. (2013). Evaluation of entomopathogenic fungi against chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis*. *Journal of Insect Science*, 13(31), 17. <https://doi.org/10.1673/031.013.3101>
- Batool, R., Umer, M. J., Wang, Y., He, K., Zhang, T., Bai, S., ... Wang, Z. (2020). Synergistic Effect of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma asperellum* to Induce Maize (*Zea mays* L.) Defense against the Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera, Crambidae) and Larval Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–29. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21218215>
- Brogdon, W. G., & Chan, A. (2012). *Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de la*

- Botella de los CDC.* Retrieved from https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf
- Buitrago, I., Muñoz, K., Bustos, A., & Cantor, F. (2010). EVALUACION DE PLANTAS HOSPEDERAS PARA LA PRODUCCIÓN DEL TRIPS *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) COMO SUMINISTRO DE PRESAS PARA SUSCONTROLADORES. *Facultad de Ciencias Basicas*, 6(1), 12–23.
- Bustillo, A. (2009). Evaluación de insecticidas químicos y biológicos para controlar *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera : Thripidae) en cultivos de espárragos. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 12–17.
- Camara de Comercio de Bogota. (2015). *Flores & follajes*. 1–42.
- Capinera, J. L. (2020). *Handbook of vegetable pests* (Second Ed; Academic Press, Ed.). London.
- Cárdenas, E., & Corredor, D. (1989). Biología del Trips *Frankliniella occidentalis* (Pegande) (Thysanoptera: Thripidae) sobre crisantemo *Chrysanthemum morifolium* L. Bajo Condiciones de Laboratorio. *Agronomía Colombiana*, VI, 71–77.
- CBI: Ministry of Foreign Affairs. (2017). *Exporting chrysanthemums to Europe*. (October).
- Cluever, J. D., Smith, H. A., Funderburk, J. E., & Frantz, G. (2018). *Western Flower Thrips (Frankliniella occidentalis [Pergande])*. Retrieved from <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN108900.pdf>
- Colombia Trade. (2019, February 26). *¿Cómo funciona el sector floricultor en Colombia?* Retrieved from <https://www.colombiatrader.com.co/noticias/como-funciona-el-sector-floricultor-en-colombia>
- Corallo, B. (2016). *Selección y caracterización de hongos entomopatógenos para controlar Thaumastocoris peregrinus en Eucalyptus spp.* (Universidad de la República). Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10171/1/uy24-18331.pdf>
- Daughtrey, M., & Buitenhuis, R. (2020). Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Ornamentals. In *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops* (Second Ed, pp. 625–679). Springer.
- Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales. (2020). *Cadena de Flores, Follajes y Ornamentales*. Retrieved from <https://sioc.minagricultura.gov.co/Flores/Documentos/2020-12-31/CifrasSectoriales.pdf>
- Dong-Gang, L., Xiao-yong, S., Reitz, S., Nauen, R., Zhong-ren, L., Lee, S. H., &

- Yu-lin, G. (2016). Field resistance to spinosad in western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Integrative Agriculture*, 15(12), 2803–2808. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61478-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61478-8)
- Du, C., Yang, B., Wu, J., & Ali, S. (2019). *Identification and Virulence Characterization of Two Akanthomyces attenuatus Isolates Against Megalurothrips usitatus (Thysanoptera: Thripidae)*.
- Edwin, M., & Giraldo, S. (2017). *ESTUDIO DE LA NECESIDAD DE ILUMINACIÓN ARTIFICIAL DURANTE LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DEL CRISANTEMO VARIEDAD ATLANTIS WHITE EN LA EMPRESA FLORES EL TRIGAL DEL MUNICIPIO DE RIONEGRO (Ant) (Universidad Nacional Abierta y a Distancia)*. Retrieved from <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/14815/32393970.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ekési, S., & Maniania, N. K. (2000). *Susceptibility of Megalurothrips sjostedti developmental stages to Metarhizium anisopliae and the effects of infection on feeding , adult fecundity , egg fertility and longevity*. (1980), 229–236.
- El Espectador. (2022). *Floricultores alcanzan cifras históricas de exportaciones en 2021*. Retrieved from <https://www.elespectador.com/economia/floricultores-alcanzan-cifras-historicas-de-exportaciones-en-2021-noticias-hoy/>
- Elhakim, E., Mohamed, O., & Elazouni, I. (2020). *Virulence and proteolytic activity of entomopathogenic fungi against the two- spotted spider mite , Tetranychus urticae Koch (Acari : Tetranychidae)*. 4–11.
- Erol, A., Abdelaziz, O., Bigucu, A., Senoussi, M., Oufroukh, A., & Karaka, I. (2020). *Effects of some entomopathogenic fungi on the aphid species , Aphis gossypii Glover (Hemiptera : Aphididae)*. (September). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00311-3>
- Esparza, M., Conteyro, A., & Fraga, M. (2017). *Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi*. 1–10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2014). *Efficacy evaluation of plant protection products. PP 1/135 (4) Phytotoxicity assessment*. 44, 265–273. <https://doi.org/10.1111/epp.12134>
- Gao, Y., Lei, Z., & Reitz, S. R. (2012). *Western flower thrips resistance to insecticides : detection , mechanisms and management strategies*. (October 2011). <https://doi.org/10.1002/ps.3305>
- Ge, W., Du, G., Zhang, L., Li, Z., Xiao, G., & Chen, B. (2020). *The Time–Concentration–Mortality Responses of Western Flower Thrips, Frankliniella occidentalis, to the Synergistic Interaction of Entomopathogenic Fungus*

Metarhizium flavoviride, *Insecticides*, and *Diatomaceous Earth*. 2.

- Gharsallah, H., Ksentini, I., Naayma, S., Taieb, K. H., Abdelhedi, N., Schuster, C., ... Leclerque, A. (2020). *Identification of fungi in Tunisian olive orchards: characterization and biological control potential*. 1–13.
- Giraldo, S., & Villa, A. (2016). *Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera*. Universidad Católica de Manizales.
- Godoy, S. (2014). *DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE INSECTOS DE LA FAMILIA THYSANOPTERA: THIRIPIDAE QUE AFECTAN AL CULTIVO DE ROSAS EN DOS ZONAS FLORÍCOLAS DE PICHINCHA – ECUADOR*.
- Golebiowski, M., Malinski, E., Nawrot, J., Szafranek, J., & Stepnowski, P. (2007). *Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips Frankliniella occidentalis*. 147, 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.01.016>
- Góngora, C., Marín, P., & Benavides, P. (2009). *CLAVES PARA EL ÉXITO DEL HONGO Beauveria bassiana COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ*. (16).
- González Bacerio, J., Hernández, J. R., & Martínez, A. del M. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial de desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por absorción interfacial. Retrieved from Revista Colombiana de Biotecnología website: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574/38075>
- Gonzales, G., & Flores, M. (2010). *EVALUACIÓN DE Chrysanthemum spp. TIPO MARGARITA CULTIVAR “Shasta” y “Fire island” DESARROLLADOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HUMUS DE LOMBRIZ EN MACETA* (Universidad Autónoma del Estado de México). Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/oca/view/20.500.11799/14162/1/24005263.pdf>
- Gracia, C., Porsani, M., Poltronieri, A., Cassilha, M., & Pimentel, C. (2018). Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). *Applied Entomology and Zoology*, (Matyjaszcyk 2015). <https://doi.org/10.1007/s13355-018-0561-0>
- Henao Camacho, T. V. (2019). *Evaluación de Chrysanthemum sp Variedad Meraki en cuatro tipos de sustrato* (Universidad de Cundinamarca). Retrieved from [https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/1700/Evaluación de Chrysanthemum sp Variedad Meraki.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/1700/Evaluación%20de%20Chrysanthemum%20sp%20Variedad%20Meraki.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Herlinda, S., Efendi, R., Suharjo, R., Hasbi, Setiawan, A., Elfita, & Verawaty, M. (2020). *New emerging entomopathogenic fungi isolated from soil in South*

Sumatra (Indonesia) and their filtrate and conidial insecticidal activity against New emerging entomopathogenic fungi isolated from soil in South Sumatra (Indonesia) and their filtrate an. (March).
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d2111115>

Infoagro. (n.d.). El cultivo del Crisantemo. Retrieved from https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_crisantemo.asp

Instituto Colombiano Agropecuario. (2017, February 10). *Flores de Cundinamarca para los corazones estadounidenses en San Valentín*. Retrieved from <https://www.ica.gov.co/noticias/agricola/flores-de-cundinamarca-para-los-corazones-estadoun>

KIRIŞIK, M., & ERLER, F. (2017). *The usage possibilities of entomopathogenic fungi in the control of western flower thrips , Frankliniella occidentalis (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)*. 7(4), 293–303.

Kivett, J.M. (2015). *Efficacy of entomopathogenic organisms beauveria bassiana, isaria fumosoroseus, metarhizium anisopliae and chromobacterium subtsugae against the western flower thrips, frankliniella occidentalis, under both laboratory and greenhouse conditions*. Kansas State University.

Kivett, J.M., Cloyd, R. A., & Bello, N. M. (2016). Evaluation of Entomopathogenic Fungi Against the Western Flower Thrips (Thysanoptera : Thripidae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Entomological Science*, 51(4), 274–291.

Kivett, Jessica M, Cloyd, R. A., & Bello, N. M. (2015). Insecticide Rotation Programs with Entomopathogenic Organisms for Suppression of Western Flower Thrips (Thysanoptera : Thripidae) Adult Populations under Greenhouse Conditions. *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 1936–1946.
<https://doi.org/10.1093/jee/tov155>

Kurtulus, A., Pehlivan, S., Achiri, T. D., & Atakan, E. (2020). *In fl uence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean fl our moth , Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera : Pyralidae)*. 85.
<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101554>

Loera-alvarado, E., Ortega-arenas, L. D., Johansen-Naime, R. M., González-hernández, H., Lomelí-flores, R., Santillán-Galicia, M. T., & Ochoa-Martínez, D. (2017). DIVERSIDAD DE TISANÓPTEROS EN CRISANTEMO [DENDRANTHEMA GRANDIFLORUM (RAMAT .) KITAMURA] VAR . HARMAN EN TEXCOCO , ESTADO DE MÉXICO. *Acta Zoológica Mexicana*, 1737(1).

Loomans, A. (2003). *Parasitoids as Biological Control Agents of Thrips Pests* (Wageningen University). Retrieved from <https://edepot.wur.nl/121435>

Maza, L., Pezzlo, M., & Baron, E. (1997). *Color Atlas of Diagnostic Microbiology*.

- Mortazavi, N., Aleosfoor, M., & Minaei, K. (2015). *Comparison of seven methods for rearing western flower thrips Frankliniella occidentalis (Thysanoptera: Thripidae)*. 34, 15–20.
- Mouden, S., Sarmiento, K., Klinkhamer, P., & Leiss, K. (2017). Integrated pest management in western flower thrips: past, present and future. *Pest Management Science*, 5(73), 813–822.
- Mukherjee, A., Debnath, P., Kumar, S., & Medda, P. (2019). Biological control of papaya aphid (*Aphis gossypii* Glover) using entomopathogenic fungi. *Vegetos*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s42535-019-00072-x>
- Muvea, A., Meyhofer, R., Subramanian, S., Poehling, H., Ekesi, S., & Maniania, N. (2014). *Colonization of Onions by Endophytic Fungi and Their Impacts on the Biology of Thrips tabaci*. 9(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108242>
- Pal, S., & Ghosh, S. K. (2014). *Diversity of soil fungi in North 24 Parganas and their antagonistic potential against Leucinodes orbonalis Guen . (Shoot and fruit borer of brinjal)*. 8707–8716. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4038-5>
- Panyasiri, C., Attathom, T., & Poehling, H. M. (2007). Pathogenicity of entomopathogenic fungi-potential candidates to control insect pests on tomato under protected cultivation in Thailand. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114(6), 278–287.
- Red Agrícola. (2020). La belleza y elegancia de los crisantemos colombianos conquistan los mercados internacionales. Retrieved from <https://www.redagricola.com/co/la-belleza-y-elegancia-de-los-crisantemos-colombianos-conquistan-los-mercados-internacionales/#:~:text=Los crisantemos colombianos tipo exportación,de otras regiones del país.>
- Reitz, S. R., Gao, Y., Kirk, W. D. J., Hoddle, M. S., Leis, K. A., & Funderburk, J. E. (2020). *Invasion Biology , Ecology , and Management of Western Flower Thrips*. 1–32.
- Restrepo, T. (2015). *Aislamiento , identificación y evaluación de hongos entomopatógenos como posibles agentes de control de trips (Thysanoptera : Thripidae) asociados a cultivos de aguacate (Persea americana Miller) Aislamiento , identificación y evaluación de hongos ent.* Universidad Nacional de Colombia.
- Rodriguez, E. (1998). *Cultivo de Crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ram)* (Universidad Autónoma Agraria “Antonio Garro”). Retrieved from <https://1library.co/document/q06xnnxq-cultivo-del-crisantemo-chrysanthemum-morifolium-ram-rodriquez-rubio.html>
- Rosa, E., Tripeni, E., Anudin, A., Apriliani, F., & Arifiyanto, A. (2020). Characterization of entomopathogenic fungi as a natural biological control of

- American cockroaches (*Periplaneta americana*). *Biodiversitas*, 21(11).
- Rotenberg, D., Jacobson, A. L., Schneeweis, D. J., & Whitfield, A. E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*, 15, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.003>
- Saady, R. H., & Mansoor, A. J. (2021). *Laboratory Evaluation of the Entomopathogenic Fungi Penicillium Marneffeii and Verticillium lecanii Against Culex Pipeins Molestus*. 15(1), 2126–2133.
- Salamanca, J., Varón, E., & Santos, O. (2010). Cría y evaluación de la capacidad de depredación de *Chrysoperla externa* sobre *Neohydatothrips signifer*, trips plaga del cultivo de maracuyá. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 31–40.
- Sanabria Nuñez, F. J. (2019). *COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE REGULADOR DE CRECIMIENTO (DAMINOZIDE) EN CRISANTEMO (Dendranthema grandiflorum) VARIEDAD ASTROID, CHIPAQUE-CUNDINAMARCA*. Universidad de Cundinamarca.
- Sciortino, C. (2017). *Atlas of Clinically Important Fungi* (Wiley-Blackwell, Ed.).
- Servicio Nacional de Sanidad, inocuidad y C. grialimentaria. (2019). *FICHA TÉCNICA Frankliniella parvula (Thysanoptera: Thripidae). Trips flor del banano*.
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic Fungi. In *Ecofriendly Pest Management for Food Security* (pp. 475–505). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>
- Skinner, M., Gouli, S., Frank, C. E., Parker, B. L., & Su, J. (2012). Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. *Biological Control*, 63(3), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.004>
- Thungrabeab, M., Blaeser, P., & Sengonca, C. (2006). *Possibilities for biocontrol of the onion thrips Thrips tabaci Lindeman (Thys., Thripidae) using different entomopathogenic fungi from Thailand*. (1994), 299–304.
- Torres, L., & Rios, R. (2007). *Formulación y desarrollo del program de manejo integral de plagas y enfermedades (MIPE) para el cumplimiento de los niveles y 2 ddel código de conducta flor verde en el cultivo flores San Juan S.A. C.I. (Funza-Cundinamarca)*. Universidad de la Salle.
- Ugine, T. A., Wraight, S. P., Brownbridge, M., & Sanderson, J. P. (2005). *Development of a novel bioassay for estimation of median lethal concentrations (LC 50) and doses (LD 50) of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana, against western X ower thrips, Frankliniella occidentalis* &. 89(2005), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.010>

- Um, M., Galadima, I., Gambo, F., & Zakaria, D. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 27–32.
- Valcarcel-Calderon, F. (2013). El control biológico de plagas en la floricultura colombiana. In Universidad del Bosque (Ed.), *Memorias Congreso Colombiano de Entomología - 40° Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología* (p. 490). Bogotá.
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: morphologies of cultured fungi and key to species* (Third Edit).
- Wraight, S. P., Ugine, T. A., Ramos, M. E., & Sanderson, J. P. (2016). Efficacy of spray applications of entomopathogenic fungi against western flower thrips infesting greenhouse impatiens under variable moisture conditions. *Biological Control*, 97, 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.016>
- Zahn, D. K., & Morse, J. G. (2013a). *Investigating Alternatives to Traditional Insecticides: Effectiveness of Entomopathogenic Fungi and Bacillus thuringiensis Against Citrus Thrips and Avocado Thrips (Thysanoptera: Thripidae)*. 64–72.
- Zahn, D. K., & Morse, J. G. (2013b). *Investigating Alternatives to Traditional Insecticides: Effectiveness of Entomopathogenic Fungi and Bacillus thuringiensis Against Citrus Thrips and Avocado Thrips (Thysanoptera: Thripidae)*. 64–72.
- Zhang, Z., Zheng, C., Keyhani, N. O., Gao, Y., & Wang, J. (2021). Infection of the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*, by the Insect Pathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. 1–15.

