

PATOGENICIDAD DE AISLADOS NATIVOS (*Beauveria bassiana*) Y (*Cordyceps javanica*) SOBRE LARVAS DE *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

PATHOGENICITY OF NATIVE ISOLATES (*Beauveria bassiana*) AND (*Cordyceps javanica*) ON LARVAE OF *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Dustin Moreno-Serrano¹*, Gladys González², Kathia Castrejón², Reynaldo Vargas^{3,4}, Bladimir Xavier Rodríguez-Hernández¹, Alex Ríos-Moreno^{1,4}*

¹Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Protección Vegetal. Panamá (dustin.moreno@up.ac.pa)
<https://orcid.org/0000-0001-9134-2222>; bladimir.rodriguez-h@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0001-5297-1595>; alex.morenom@up.ac.pa
<https://orcid.org/0000-0003-3117-9659>

²Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Panamá (gladys.gonzalezd@idiap.gob.pa; lilinet03041988@gmail.com)

³Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia. Panamá (reynaldo.vargas@up.ac.pa)
<https://orcid.org/0000-0002-5420-9761>

⁴Sistema Nacional de Investigación de Panamá (SNI), Panamá

*Correo de Correspondencia: dustin.moreno@up.ac.pa, alex.morenom@up.ac.pa

Recibido:21/07/2021

Aceptado:21/02/2022

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad patogénica de aislados nativos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400) y *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006), obtenidos del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). La evaluación fue realizada mediante bioensayos en condiciones de laboratorio, utilizando larvas de V instar del insecto modelo *Galleria mellonella*, sumergiéndolas en suspensiones de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios ml^{-1} , obtenidas de un pie de cría de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, sede Chiriquí. Se determinó la mortalidad expresada por los aislados en relación con el tiempo, estimándose el tiempo letal medio TL50, y la concentración letal media CL50. En todos los casos se presentaron porcentajes de mortalidad mayores al 80% para ambos aislados y se observaron diferencias intraespecíficas en la mortalidad de las larvas tratadas a concentraciones de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios ml^{-1} para ambos aislados. De acuerdo con los resultados obtenidos *Cordyceps javanica* fue más patogénico con TL50: 7.00 días y CL50: 1.23×10^8 conidios ml^{-1} , aunque el aislado IDIAP D-Bb1400, también mostró un excelente potencial (TL50: 7.31 días y CL50: 1.55×10^8 conidios ml^{-1}). Sin embargo, no hubo diferencias significativas interespecíficas ($\chi^2(2) = 0.41$, $p = 0.81$) entre ambos aislados y concentraciones evaluadas. Mediante este trabajo se evidenció por primera vez el gran potencial patogénico de ambos aislados en las larvas tratadas de *G. mellonella* en condiciones de laboratorio, por lo que sería importante y coherente realizar evaluaciones en campo con estos y otros aislados nativos, debido a su promisorio potencial en el control de plagas en la agricultura.

PALABRAS CLAVE: Control biológico, Hongos entomopatógenos, IDIAP D-Bb1400, IDIAP RS-Cj006, Mortalidad.

ABSTRACT. The objective of this work was evaluated of the pathogenic capacity of native isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400) and *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006), obtained from the Institute of Agricultural Innovation of Panama (IDIAP). The evaluation was carried out through bioassays under laboratory conditions, using V instar larvae of the *G. mellonella* model insect dipping then in fungal suspensions of 1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 conidia ml^{-1} obtained from a breeding stock of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Panama. For the evaluation, the mortality expressed by the isolates in relation to time was determined, estimating the mean lethal time TL50, and the mean lethal concentration LC50. In all cases, mortality percentages greater than 80% were presented for both isolates and intraspecific differences were observed in the mortality of the treated larvae at concentrations of 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidia ml^{-1} for both isolates. According to the results obtained, the isolation of *Cordyceps javanica* was more pathogenic with (TL50: 7.00 days and LC50: 1.23×10^8 conidia ml^{-1}), although the isolate IDIAP D-Bb1400 also showed excellent potential (TL50: 7.31 days and LC50: 1.55×10^8 conidia ml^{-1}). However, there were no significant interspecific differences ($p = 0.41$) between both isolates and concentrations evaluated ($\chi^2(2) = 0.41$, $p = 0.81$). Through this work, the great pathogenic potential of both isolates was evidenced for the first time in the treated larvae of *G. mellonella* under laboratory conditions, so it would be important and coherent to carry out field evaluations with these and other native strains, due to their promising potential in pest control in agriculture.

KEYWORDS: Biological control, Entomopathogenic fungi, IDIAP D-Bb1400, IDIAP RS-Cj006, Mortality.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos en Panamá son afectados por una variedad de plagas insectiles que provocan muchas pérdidas y donde su control principalmente es utilizando plaguicidas con compuestos químicos que perjudican gravemente el ambiente (Martínez, 2009). Ciertamente el uso de estos compuestos ha producido grandes beneficios agrícolas y a la vez, graves problemas de salud pública. Por ello, es importante realizar aportaciones científicas para el control alternativo de estas plagas como el uso de hongos entomopatógenos nativos o comerciales.

Los hongos entomopatógenos (HE), son microorganismos que poseen la capacidad de infectar y matar artrópodos. Esta capacidad ha permitido que se utilicen como una alternativa segura a los insecticidas químicos tóxicos para el control de plagas (Altamira, 2020).

Las especies pertenecientes al orden Hypocreales, conformado por más de 750 especies de HE, han sido ampliamente estudiados y utilizados en biocontrol debido a que tienen un gran rango de huéspedes y son fáciles de producir a gran escala (Butt *et al.*, 2016). Alrededor del 80% de los productos HE disponibles en el mercado se basan en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (Butt *et al.*, 2016; Faria & Wraight, 2007). Estos géneros están conformados por diferentes especies que en el transcurso del tiempo han ido aumentando debido a los nuevos aislamientos que se realizan en todo el mundo y al empleo de técnicas moleculares que permiten su identificación de forma certera y concluyente.

Los HE no sólo controlan naturalmente las poblaciones de artrópodos, sino que también forman complejas relaciones con las plantas. Se ha demostrado que las especies de HE, *M. robertsii* y *B. bassiana*, proporcionan a las plantas parte del nitrógeno que ellos asimilan durante la parasitación de insectos (Behie & Bidochka, 2014; Litwin *et al.*, 2020), promoviendo el crecimiento de estas (Ríos-Moreno *et al.*, 2016). *Beauveria bassiana* actúa como endófito (coloniza el interior de las plantas) de aproximadamente 25 especies de plantas, contribuyendo al control de plagas y hongos fitopatógenos (McKinnon *et al.*, 2017; Litwin *et al.*, 2020; Vega, 2018). Este hongo coloniza hojas y brotes, además de las raíces, permitiendo que las plantas sean más resistentes a los insectos (Klieber & Reineke 2016; Litwin *et al.*, 2020).

Los HE se han desarrollado como una importante táctica dentro de la estrategia de manejo integrado de plagas en las últimas décadas (Quesada-Moraga *et al.*, 2009), debido a que presentan mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula; lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (Charnley & Collins, 2007; Faria & Wraight, 2007; Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2008). En ese sentido, es necesario seguir aportando estudios sobre la patogenicidad y endofitismo de diversos hongos en los diferentes lugares del mundo y en las diferentes especies de insectos plagas (Hernández *et al.*, 2019).

La polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) conocido por ser una plaga en la industria apícola por sus hábitos alimenticios de las larvas y a los túneles que forman en medio de los panales (Rijo *et al.*, 1996; Jackman & Drees, 1998; Chandel *et al.*, 2003). Sin embargo, aparte de ser considerada una importante plaga en la apicultura, se utiliza en muchos

lugares como un organismo modelo de estudio y se debe a que existe una buena correlación al evaluar la patogenicidad de varios microorganismos como es el caso de hongos y bacterias en larvas de *G. mellonella* (Jander *et al.*, 2000; Joyce & Gahan, 2010). La comprensión del sistema inmunológico de *G. mellonella* para limitar o eliminar el ataque de patógenos, también ha ayudado a caracterizar este organismo como un modelo de estudio (Kavanagh & Fallon, 2010; Vilcinskas, 2010; Harding *et al.*, 2013). Esto se debe a que los hemocitos son el principal mediador de las defensas celulares y son el tipo de célula más numeroso que se encuentra en la hemolinfa de *G. mellonella* (Lavine & Strand, 2002). Estas células son fagocitos y realizan funciones similares a los macrófagos y neutrófilos humanos.

Las larvas de *G. mellonella*, también son utilizadas como hospedantes alternativos para la producción de parasitoides y otros enemigos naturales de plagas perjudiciales para los agroecosistemas (Gallo *et al.*, 1988). Es por esto que destaca como insecto modelo al evaluar la patogenicidad e incluso se utiliza como insecto trampa para capturar microorganismos como los hongos entomopatógenos (Vilcinskas, 2010).

Por todo lo expuesto, el propósito de esta investigación fue evaluar la patogenicidad de aislados nativos de hongos entomopatógenos obtenidos en la Provincia de Chiriquí, utilizando larvas de *G. mellonella* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área del Estudio

El estudio se realizó en el Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) en David y en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá, sede Chiriquí.

Cría de Larvas de *G. mellonella*

La cría y evaluación biológica de *G. mellonella*, se estableció obteniendo larvas de panales infestados con la polilla, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá sede Chiriquí (8°23'41.79''N – 82°19'47.60''O) y trasladadas al laboratorio de entomología del Instituto de Innovación Agropecuaria, David, provincia de Chiriquí al occidente de la República de Panamá (8°26'05.48''N – 82°27'47.94''O). El pie de cría se estableció en una dieta artificial, que consistió en una mezcla de 400 g de salvado de trigo, 120 g de harina de trigo, 160 g de leche de ternero y 300 ml de miel por cada 680 g de dieta. Los valores ambientales registrados durante los 62 días en promedio que tardó el ciclo biológico de *G. mellonella*, en °C y humedad relativa (HR) fueron un mínimo de 25°C y un máximo de 33°C con una HR de 58% y un máximo de 86%, respectivamente; obteniendo un promedio de 28°C y 76% de HR. Durante el ciclo biológico se determinó los instares larvarios del insecto bajo las condiciones ambientales del área de estudio, donde se establecen ocho instares larvales, utilizando como referencia la exuvia de la cápsula cefálica (Flores-Pérez *et al.*, 2005).

Hospedantes

Las larvas empleadas de *G. mellonella* fueron obtenidas del pie de cría que se mantuvo bajo condiciones de asepsia. Para este bioensayo, se emplearon larvas de instares intermedios, por lo que selecciono el instar V, de acuerdo con la biología realizada por el equipo de investigación institucional.

Hongos entomopatógenos

Los aislados nativos de *Beauveria bassiana* (IDIAP D-Bb1400) y *Cordyceps javanica* (IDIAP RS-Cj006), pertenecen a la primera colección de HE con utilidad en la agricultura del IDIAP y que recientemente fueron caracterizados de forma morfofisiológica y molecular (González-Dufau *et al.*, 2015; González-Dufau *et al.*, 2021). Estos aislados se multiplicaron utilizando medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), con antibiótico (Cloranfenicol 0.5 g/L) dentro de una cámara estéril de flujo laminar para evitar contaminación y la incubación se realizó a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Preparación de suspensión de Conidios: La suspensión de conidios se obtuvo a partir de la multiplicación masiva de los dos hongos y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural, que en este caso fue arroz y que fueron mantenidas bajo condiciones asépticas en incubadoras a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 días. Luego, la matriz se sumergió en una solución de agua estéril con Tween 80 al 0,1% como dispersante de conidios. Estas suspensiones iniciales se sonicaron durante cinco minutos para homogeneizar la suspensión conidial y luego se filtraron a través de varias capas de estopilla para eliminar las estructuras miceliales.

Las suspensiones de conidios utilizadas para los bioensayos se calcularon realizando diluciones seriadas en agua destilada estéril a partir de una solución concentrada obtenida de una matriz y utilizando una cámara de Neubauer para realizar los conteos de conidios y la fórmula de French & Hebert, (1982). El tiempo de germinación de los conidios se determinó en ensayos anteriores con un Tiempo Medio de Germinación (TG50) de 9.38 horas para el aislado RS-CJ006 y 13.97 horas para D-Bb1400, según González-Dufau *et al.*, (2021).

Número de conidios/ml= No. de conidios x factor de cámara (10^4) x factor de dilución

Patogenicidad de las Aislados D-Bb1400 Y RS-Cj006

La patogenicidad fúngica por aislados se evaluó en diez larvas de quinto estadio de *G. mellonella*, por replica, estas fueron sumergidas en diluciones de 1×10^7 conidios ml^{-1} durante 20 segundos y luego se colocaron individualmente en placas de Petri con dieta a temperatura ambiente promedio registrada de 26.2 con un mínimo de 25.1 y un máximo de 26.8°C; se realizó la misma metodología utilizando un grupo de larvas nuevas para las diluciones 1×10^8 y 1×10^9 conidios ml^{-1} respectivamente. La mortalidad sobre las larvas se registró diariamente durante 10 días posteriores al ensayo. Las larvas muertas se esterilizaron inmediatamente con hipoclorito de sodio al 1%, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron en platos Petri con papel filtro humedecido con agua estéril a temperatura ambiente, con el fin de observar crecimiento de estructuras fúngicas. Las larvas utilizadas como control se sumergieron en agua estéril con Tween

80 al 0,1% y se evaluaron de igual forma. Se empleó un diseño completamente al azar y se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento incluyendo el control.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se tabularon en una hoja de cálculo de Microsoft Excel®. Se verificó la normalidad y los valores atípicos de todos los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y posteriormente, la prueba de Levene para verificar la homocedasticidad de varianzas, antes de realizar cualquier análisis estadístico.

En algunos casos se utilizó la prueba no paramétrica de Chi Cuadrado para análisis de Proporciones. Los resultados fueron expresados como Media \pm DS (desviación estándar). Se empleó un nivel de significancia de $p < 0.05$, y los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTICA versión 10 (StatSoftV10) y los gráficos con Graph Pad Prism V.9.0. (San Diego, CA, USA).

La concentración letal media (CL50) se calculó a través del estimador de análisis Probit y el tiempo letal medio se determinó utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los datos de supervivencia de *G. mellonella* durante los diez días de ensayo, se analizaron con el estimador no paramétrico Kaplan-Meier.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Resultados

El estimador de supervivencia no paramétrico Kaplan-Meier (**Figura 1**) mostró que no hubo diferencias significativas para ambas aislados ($\chi^2_{(1)} = 1.41$, $p = 0.23$).

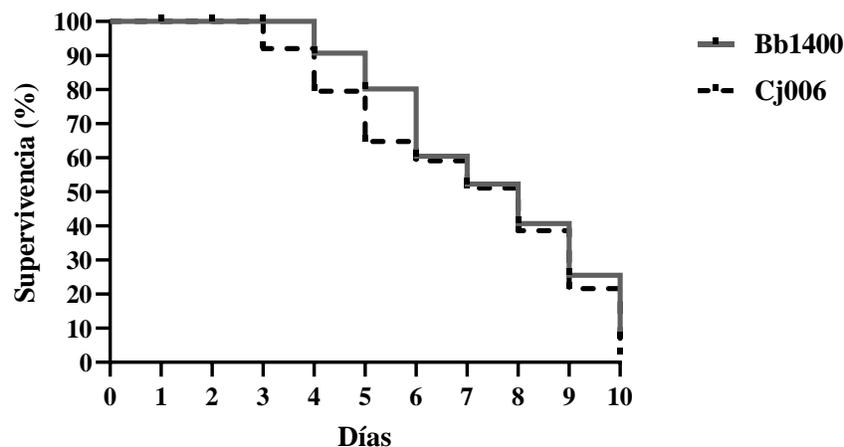


Figura 1. Porcentaje y días de supervivencia de acuerdo con las aislados IDIAP D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006, sobre instares (V) de *Galleria mellonella*.

La mortalidad para el aislado D-Bb1400 fue de 80, 86 y 100% para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidios ml^{-1} respectivamente y para RS-Cj006 fue de 90, 96.6 y 100% para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidios ml^{-1} . La (Figura 2a) muestra la mortalidad de las larvas tratadas de los aislados D-Bb1400 y RS-Cj006 e indican que no hubo diferencias significativas de supervivencia ($p = 0.41$) entre ambos aislados y concentraciones evaluadas. ($\chi^2_{(2)} = 0.41$, $p = 0.81$). Se observa que en la aislados D-Bb1400 hubo diferencias en la mortalidad entre la concentración 1×10^9 con respecto a 1×10^7 conidios ml^{-1} ($\chi^2_{(1)} = 15.05$, $p = 0.001$) y 1×10^8 ($\chi^2_{(1)} = 22.22$, $p = 0.001$). Con relación, al aislados RS-Cj006 hubo diferencias estadísticamente significativas entre la concentración 1×10^7 con 1×10^8 conidios ml^{-1} (concentraciones ($\chi^2_{(2)} = 4.03$, $p = 0.04$) y entre 1×10^7 y 1×10^9 conidios ml^{-1} ($\chi^2_{(1)} = 10.53$; $p = 0.001$) y una tendencia entre las concentraciones 1×10^8 y 1×10^9 ($\chi^2_{(1)} = 3.05$; $p = 0.08$) (Figura 2b).

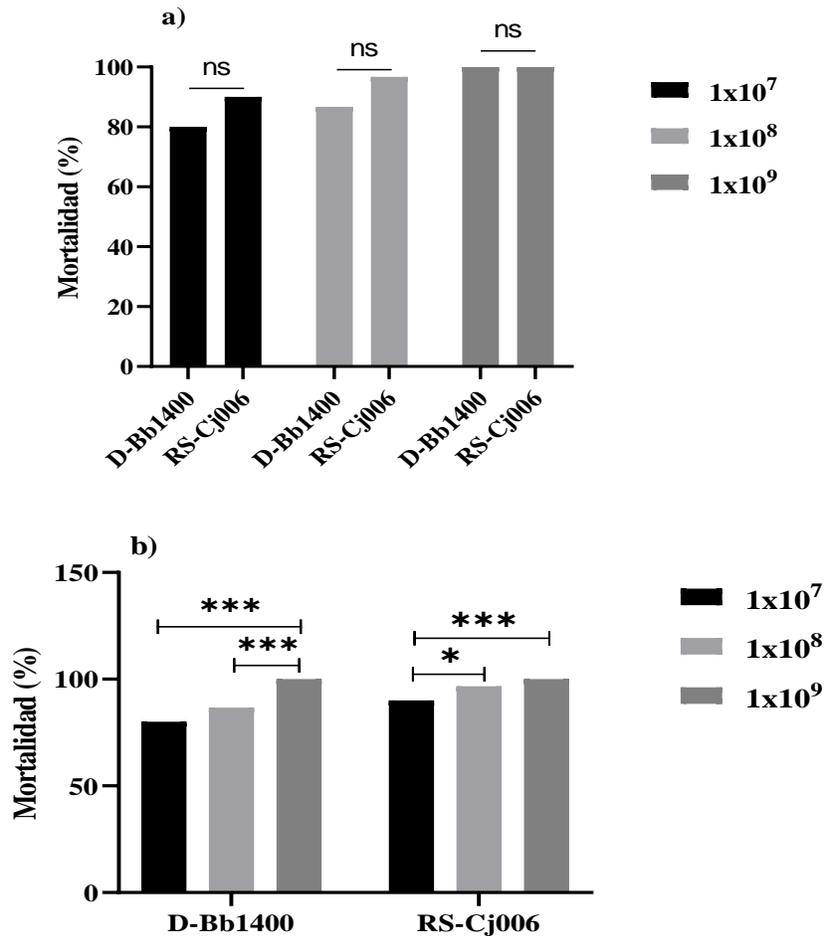


Figura 2. Mortalidad para larvas de V instar de *G. mellonella*, inoculadas con suspensiones fúngicas de los aislados D-Bb1400 y RS-Cj006 (a) a concentraciones de 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 conidios ml^{-1} (b). *ns* $p > 0.05$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

D-Bb1400 y IDIAP RS-Cj006 fueron de 7.31 ± 0.22 y 7.00 ± 0.25 días respectivamente ($p > 0.05$). El CL50 se calculó con la función Probit dando como resultado 1.23×10^8 conidios ml^{-1} (6.86-7.76 IC 95%) para el aislado RS-Cj006 y 1.55×10^8 conidios ml^{-1} (6.48-7.51 IC 95%) para el aislado D-Bb1400 ($p > 0.05$; **Tabla 1**). La TL50 para el aislado IDIAP

Tabla 1. Valor del tiempo y concentración letal media (TL50), (CL50), sus intervalos de confianza al 95%, de los aislados D-Bb1400 y RS-Cj 006, a concentraciones de 1×10^7 , $8,9$ conidios ml^{-1} sobre larvas de V instar de *G. mellonella*.

AISLADOS	CL50 (Conidios ml^{-1})	TL50 (Días promedio \pm SE)	IC 95% (Días)
IDIAP D-Bb1400	1.55×10^8 ^a	7.31 ± 0.22 ^a	6.48-7.51
IDIAP RS-Cj006	1.23×10^8 ^a	7.00 ± 0.25 ^a	6.86-7.76

Las mismas letras dentro de las columnas indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el TL50 y en la CL50 en conidios ml^{-1} . IC= intervalo de confianza al 95%.

- **Discusión**

La patogenicidad de los dos aislados nativos fue evaluada utilizando larvas del V instar del insecto modelo de estudio *G. mellonella*, proveyendo interesantes resultados según nuestro conocimiento por primera vez en Panamá.

En el presente estudio se obtuvo un TL50 de 7.31 y 7.00 días, una CL50 de 1.55×10^8 y 1.23×10^8 conidios ml^{-1} para los aislados D-Bb1400 y RS-Cj006 respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ambos aislados ($p=0.41$) pero si intraespecíficas para las concentraciones evaluadas. Sin embargo, es notable que IDIAP D-Bb1400 mostró un porcentaje inferior de mortalidad para cada concentración presentando diferencias intraespecíficas en la concentración 1×10^9 conidios ml^{-1} en donde alcanzó un 100% de mortalidad, en comparación a las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidios ml^{-1} que lograron 80.0 y 86.6%, respectivamente en los días evaluados y por consiguiente su CL50 es mayor en comparación al aislado RS-006 y mostró estadísticamente diferencias significativas dentro de las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 versus 1×10^9 conidios ml^{-1} , cabe destacar que se logró una mortalidad de 90.0, 96.6 y 100%, para las concentraciones 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios ml^{-1} para el aislado RS-006. No obstante, presentó diferencias significativas de la concentración 1×10^7 versus 1×10^9 conidios ml^{-1} y mostró un porcentaje levemente más alto de mortalidad que el aislado D-Bb1400, cabe destacar que el testigo mostro 0% de mortalidad durante el ensayo.

Estos resultados son notables si se comparan con experimentos similares en donde, *C. javanica* ha mostrado un gran potencial como agente de biocontrol para varias plagas de insectos, dando como resultados tiempo medio de supervivencia (TMS) similares a los nuestros para larvas de lepidópteros y variando de acuerdo al orden de insecto, resulta importante mencionar que el aislado (RS-Cj006) recientemente se caracterizó molecularmente siendo encontrada y aislada a partir de broca del café (*Hypothenemus hampei*) (González-Dufau *et al.*, 2015) con accesión al (GenBank: KF373690), lectotipo de la especie. En recientes investigaciones en Estados Unidos, se ha utilizado el aislado (Cj-wf-GA17) de *C. javanica* a una concentración de 1×10^6 conidios ml^{-1} contra larvas de *G. mellonella* del último instar, con el objetivo de determinar su potencial patogénico, bajo condiciones controladas de (20, 25, 30 y 35 °C) que fluctúan dentro de nuestro promedio registrado

que fue 26.2 con un mínimo de 25.1 y un máximo de 26.8°C; en la investigación mencionada se obtuvieron resultados de mortalidad de 25, 78 y 30% a temperaturas de 20, 25 y 30°C respectivamente durante 7 días, sin embargo se realizó un segundo ensayo ampliando el rango de días de evaluación a 14 y se registró un porcentaje de mortalidad superior de 95, 100 y 80% en las temperaturas mencionadas anteriormente (Wu *et al.*, 2020).

En otras investigaciones se informa que *C. javanica* también ataca otros lepidópteros como la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*, donde se ha reportado mortalidades de 85, 80 y 90% para huevo, larvas y pupas a concentración de 1×10^8 conidios ml^{-1} durante 5 días a una temperatura de 27°C y se ha demostrado que existe una relación inversamente proporcional, que ha medida que aumenta la concentración así mismo aumenta la mortalidad de los individuos (Cheng *et al.*, 2018).

Otro estudio demostró que *C. javanica* fue patógeno para dos especies de áfidos, *Hyalopterus pruni* y *Aphis pomi*, causando 66,67 y 75,59% de mortalidad, respectivamente, después de seis días de inoculación con una suspensión que contenía 1×10^8 conidios ml^{-1} (Hasan *et al.*, 2012). Incluso, *Cordyceps javanica* fue moderadamente virulenta contra la polilla gitana *Lymantria dispar* (mortalidad 58-100%) al sumergir las larvas en la suspensión de conidios (1×10^8 conidios ml^{-1}) (Shimazu & Takatsuka, 2010).

En el caso de *Beauveria bassiana* el aislado (D-Bb1400), alcanzó un TMS de 7.31 días y una CL50 de 1.55×10^8 conidios ml^{-1} , por lo tanto, fue moderadamente menos virulenta y causó una mortalidad inferior a RS-Cj006, en las concentraciones evaluadas, cabe destacar que no hubo diferencias significativas entre estas y que ambas mostraron un 100% de mortalidad en la concentración 1×10^9 conidios ml^{-1} . Estos resultados, son similares a los obtenidos por González-Dufau *et al.*, (2021), que con estos aislados evaluados en *Hypothenemus hampei*; quienes reportaron 100 % de mortalidad a los 15 días y Tiempo letal medio (TL50) de 3.98 días para el aislado RS-Cj006 y 7.86 días para el aislado D-Bb1400 a una concentración de 1×10^9 conidios ml^{-1} .

En algunas investigaciones similares se identificaron datos muy parecidos a los obtenidos en esta investigación donde larvas de *G. mellonella* tratadas con el aislado 80.2 de *Beauveria bassiana* nativo de Francia a concentraciones $1 \times 10^1 - 1 \times 10^3$, muestran que para obtener un 100% de mortalidad se necesitaron en promedio 7-9 días, mostrando síntomas de infección a los 4-5 días aproximadamente (Wojda *et al.*, 2009; Vertyporokh *et al.*, 2020).

Bidochka *et al.*, (2002), evaluó 61 aislados de *B. bassiana* a una concentración de 1×10^7 conidios ml^{-1} y reportando un TMS de 3,2 días para *G. mellonella*. Sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación y puede asociarse a que, la patogenicidad de cada aislado está influenciada por componentes de origen genético (Mena, 1999). Por otro lado, los TMS para *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleurodidae) en donde ninfas fueron tratadas con aislamientos de *B. bassiana* varían de 5.9 a 7.4 días a una concentración de $1 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ conidios ml^{-1} (Quesada-Moraga *et al.*, 2006a). En otros estudios el TMS fue de 5,4 a 14,4 días para 10 aislados de *B. bassiana* en concentraciones de (1×10^7 y 1×10^8 conidios ml^{-1}) para la patogenicidad frente a *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (Quesada-Moraga *et al.*, 2006b). Además, en adultos de *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) tratado con tres aislamientos *B. bassiana* (1×10^7 conidios ml^{-1}) (Liu & Bauer, 2006) el TMS fue de 4,2 días.

Es importante mencionar que el potencial patogénico de ambos aislados RS-Cj006 y D-Bb1400 podría estar influenciado por diversos factores: a) presencia de adherencias en la superficie de los conidios en unión a la cutícula de insectos (Anand *et al.*, 2009), b) una o más factores de virulencia como quitinasas, proteasas Pr1 y Pr2. (Anand *et al.*, 2009; Santi *et al.*, 2010) y c) presencia de colágeno, capa protectora que permite a los hongos superar la inmunidad innata de los insectos cuando llega el hongo en contacto con la hemolinfa (Anand *et al.*, 2009; Freed., 2012). Por lo que es importante seguir evaluando diferentes aislados de hongos entomopatógenos, como las de este estudio, debido a su posible potencial en el control de plagas en la agricultura.

CONCLUSIONES

Los aislados D-Bb1400 e RS-Cj006 mostraron una excelente actividad biocontroladora sobre *G. mellonella* en laboratorio, ocasionando mortalidades entre (80-100%) y (90-100%).

Teniendo en cuenta la alta mortalidad causada bajo condiciones de laboratorio sobre larvas de *G. mellonella*, ambos aislados IDIAP D-Bb1400 e IDIAP RS-Cj006 son promisorios para hacer estudios de formulación y la posterior evaluación bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaria Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT) y al Sistema Nacional de Investigación (SNI), por financiar este proyecto de investigación.

Al Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá, por autorizar la utilización de los aislados de hongos entomopatógenos evaluadas.

A grupo CALESA, por suministrarnos la metodología e ingredientes para preparar la dieta artificial del insecto.

REFERENCIAS

Altamira, P. (2020). Microorganismos con actividad entomopatógena. Boletín No.419, INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

Anand, R., Prasad, B. & Tiwary, B. (2009). Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. *BioControl*, 54(1), 85–92 pp. doi: <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9157-x>

- Behie, W. & Bidochka, M. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied Environmental Microbiology*, 80(1), 1553–1560 pp.
- Bidochka, M., Menzies, F. & Kamp, A. (2002). Genetic Bassiana, groups of the insect-pathogenic fungus *beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology*, 178(1), 531–537 pp.
- Butt, T., Coates, C., Dubovskiy, I. & Ratcliffe, A. (2016). Chapter nine-entomopathogenic fungi: New insights into host-pathogen interactions. *Advances in Genetics*, 94(1), 307–364 pp.
- Chandel, Y., Sharma, S. & Verma, K. (2003). Comparative biology of the greater wax moth, *Galleria mellonella* and lesser wax moth, *Achoria grisella*. *Forest Pest Management and Economic Zoology*, 11, 69-74 pp.
- Charnley, A. & Collins, S. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. in Kubicek and Druzhinina (eds), *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships (2nd edition)*, 159-187 pp.
- Cheng, X., Gao, Y., Yang, Ch., Zhang, Xi., Qin, F., Lu, J., Gao, Y. & Xu, R. (2018). Potencial del hongo entomopatógeno *Isaria javanica* para el control del gusano de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Israel Journal of Entomology*, 48(2), 197–208 pp. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1453866>
- Faria, M. & Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international clasification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256 pp. doi: [10.1016/j.biocontrol.2007.08.001](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001)
- Flores-Pérez, L., Bautista, N., Valdez, J., Morales, O. & Quiñones, S. (2005). Comparación de dos técnicas de medición de cápsulas cefálicas para separar estadios larvales de *Copitarsia incommoda* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta zoológica mexicana*, 21(2), 109-113 pp.
- Freed, S., Jin Feng-Lian., Muhammad, N., & Hussian, A. (2012). Toxicity of Proteins Secreted by Entomopathogenic Fungi against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *International journal of agriculture and biology*, 14(2), 291–295 pp.
- French, E., & Hebert, T. (1982). Metodología de investigación fitopatología. ed. M de la Cruz. San José, Costa Rica, IICA. 290 pp.
- Gallo, D., Nakano, S., Silveiro, N., Carvalho, G., Batista, E., Berti, F., Parra, R., & Zucchi, S. (1988). En: *Manual de entomologia agrícola*. 2nd. edición. Ed. Agronómica Ceres Ltda., Sao Paulo, 291-293 pp.
- González Dufau, G., Caballero, S., G, Contreras., Vergara, G., & Mejía, L. (2015). Caracterización morfológica y molecular del aislado endémico RS006, biocontrolador de *Hypothenemus*

- hampei* en Panamá. *Revista Ciencia Agropecuaria*, 22(1), 78–85pp. <http://www.revistacienciaagropecuaria.ac.pa/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/166/131>
- González Dufau, G., Monzón, A., Santamaría Guerra, J., Santo, U., Caballero, S., Castrejon, K., & Sanjur, M. (2021). Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglè. *La Calera*, 21(36). <https://doi.org/10.5377/calera.v21i36.11555>
- Harding, C., Schroeder, G., Collins, J., & Frankel, G. (2013). Use of *Galleria mellonella* as a Model Organism to Study *Legionella pneumophila* Infection. *Journal of Visualized Experiments*, 81, e50964, doi:10.3791/50964
- Hasan, W., Assaf, L., & Abdullah, S. (2012). Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sites and evaluation for their entomopathogenic potential. *Bulletin of the Iraq Natural History.Museum*, 12(1), 19–27 pp. <https://www.iasj.net/iasj?func=article&aId=60719>
- Hernández, P., Martínez, R., & Padilla, A. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/editorial/index.php/forestales/article/view/496>
- Jackman, J. & Drees, B. (1998). A field guide to Texas insects. Houston: Gulf Publishing Company.
- Jander, G., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology*, 182(1), 3843-384 pp.
- Joyce, S. & Gahan, C. (2010). Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology*, 156(1), 3456-3468 pp.
- Kavanagh, K. & Fallon, J. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, 24(1), 79–83 pp. doi: [10.1016/j.fbr.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.04.001)
- Klieber, J. & Reineke, A. (2016). The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Journal Applied Entomology*, 140(1), 580–589 pp.
- Lavine, M. & Strand, M. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 32(1), 1295-1309 pp.
- Liu, H. & Bauer, L. (2006). Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1096–1103 pp. doi: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.4.1096>

- Litwin, A., Nowak, M. & Rózsalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 19(1), 23-42 pp.
- Martínez, E. (2009). Selección de hongos entomopatógenos para el control biológico de áfidos (*T. citricida*) de Coclé. Trabajo de grado (maestría en microbiología ambiental). Vicerrectoría de investigación y postgrado, Universidad de Panamá.
- McKinnon, A., Saari, S., Moran-Diez, M., Meyling, N., Raad, M. & Glare, T. (2017). *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *Biocontrol*, 62(1), 1–17 pp.
- Mena, J. (1999). Patogenicidad y variación de efectividad de *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae* en diferentes condiciones ambientales, en poblaciones naturales de *Premnotripex vorax* (Hustache). Trabajo de grado (maestría en biología). Facultad de Ciencias, Universidad del valle.
- Quesada-Moraga, E., Maranhao, E., Valverde, G. & Santiago-Álvarez, C. (2006a). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialetrodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36(1), 274–287 pp.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz, G. & Santiago-Álvarez, C. (2006b). Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 1955–1966 pp.
- Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I. & Santiago-Álvarez, C. (2008). Autodissemination of *Metarhizium anisopliae* between adults of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 47(1), 115–124 pp. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.002>
- Quesada-Moraga, E., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Muñoz-Ledesma, F., García-Fernández, P. y Santiago-Álvarez, C. (2009). Los hongos entomopatógenos y sus proteínas insecticidas en el control de plaga de insectos. *III Jornadas de Divulgación de La Investigación En Biología Molecular, Celular y Biotecnología. Córdoba, España.*, 15–19 pp.
- Ríos-Moreno, A., Garrido-Jurado, I., Resquín-Romero, G., Arroyo-Manzanares, N., Arce, L. & Quesada-Moraga, E. (2016). Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(1), 1574-1585 pp.
- Rijo, E., Matos, N. y Barrios, A. (1996). Desarrollo de *Galleria mellonella* alimentada con dieta a base de derivados de la industria azucarera. *Ciencia Tecnología Agrícola en Protección de Plantas*, 12(1), 61-69 pp.

- Santi, L., Beyes de Silva, W., Berger, M., Guimares, J., Schrank, A. & Vainstein, M. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874–880 pp. doi: [10.1016/j.toxicon.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.012)
- Shimazu, M. & Takatsuka, J. (2010). *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 45(3), 497–504 pp. doi: [10.1303/aez.2010.497](https://doi.org/10.1303/aez.2010.497)
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koire, M., Maniania, N., Monzón, A., Rangel, D. & Roy, H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159 pp. doi: [10.1016/j.funeco.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001)
- Vega, F. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110, 4–30 pp.
- Vertyporokh, L., Hulaś-Stasiak, M. & Wojda, I. (2020). Host-pathogen interaction after infection of *Galleria mellonella* with the filamentous fungus *Beauveria bassiana*. *Insect science*, 27(5), 1079–1089 pp. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12706>
- Vilcinskis, A. (2010). Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insect. *Virulence*, 1(3), 206–214 pp. doi: [10.4161/viru.1.3.12072](https://doi.org/10.4161/viru.1.3.12072)
- Wojda, I. (2017) Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24(1), 342–357 pp.
- Wu, S., Toews, M., Oliveira-Hofman, C., Behle, R., Simmons, A. & Shapiro-Ilan, D. (2020). Environmental Tolerance of Entomopathogenic Fungi: A New Strain of *Cordyceps javanica* Isolated from a Whitefly Epizootic Versus Commercial Fungal Strains. *Insects*, 11(10), 711 pp. <http://dx.doi.org/10.3390/insects11100711>