

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



POTENCIAL DE BIOCONTROL DE HONGOS ENDÓFITOS NATIVOS CONTRA
***AEGORHINUS SUPERCILIOSUS* (GUÉRIN) (COLEÓPTERA:**
CURCULIONIDAE) EN AVELLANO EUROPEO

POR

MARCELO PABLO PEÑA GARRIDO

MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.

CHILLÁN – CHILE
2024

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**POTENCIAL DE BIOCONTROL DE HONGOS ENDÓFITOS NATIVOS CONTRA
AEGORHINUS SUPERCILIOSUS (GUÉRIN) (COLEÓPTERA:
CURCULIONIDAE) EN AVELLANO EUROPEO**

POR

MARCELO PABLO PEÑA GARRIDO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

Aprobada por:

Profesor Asociado. Gonzalo Silva A.
Ing. Agrónomo, M. Sc. Dr.

Guía

Lorena Barra B.
Ing. Agrónomo, M. Sc., Dr.
INIA Quilamapu

Guía externo

Profesor Asociado. Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Profesor Asociado. Inés Figueroa C.
Ing. Agrónomo, M. Sc. Dr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo. M. Sc.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Al Centro Nacional de Bioinsumos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA por las facilidades entregadas para la realización de la tesis y al Gobierno regional de Ñuble por el financiamiento de los ensayos mediante el proyecto de biocontrol en avellano europeo con endófitos, Código BIP 40032579-0.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos.....	6
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones.....	18
Referencias.....	18

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Insectos vivos (%) a los 13 días tras un tratamiento por inmersión con cepas RGM 1523 (<i>Purpureocillium</i>), RGM 2250 (<i>Beauveria</i>) y RGM 2396 (<i>Beauveria</i>).	13
Figura 2	Mortalidad (%) a los 13 días de <i>Aegorhinus superciliosus</i> tratados por inmersión con cepas RGM 1523 (<i>Purpureocillium</i>), RGM 2250 (<i>Beauveria</i>) y RGM 2396 (<i>Beauveria</i>)	14
Figura 3	Parasitismo (%) a los 13 días de <i>Aegorhinus superciliosus</i> tratados por inmersión con cepas RGM 1523 (<i>Purpureocillium</i>), RGM 2250 (<i>Beauveria</i>) y RGM 2396 (<i>Beauveria</i>).....	15
Figura 4	Área (%) consumida por adultos de <i>Aegorhinus superciliosus</i> en hojas inoculadas con las cepas RGM 2396 y RGM 2250 de <i>Beauveria</i> spp.....	16
Tabla 1	Cepa, especie y locación de extracción de los inóculos utilizados en la presente investigación.....	6
Tabla 2	Porcentaje de colonización endofítica en <i>Corylus avellana</i> de cepas resultantes endófitas de hongos entomopatógenos	12

POTENCIAL DE BIOCONTROL DE HONGOS ENDÓFITOS NATIVOS CONTRA *AEGORHINUS SUPERCILIOSUS* (GUÉRIN) (COLEÓPTERA: CURCULIONIDAE) EN AVELLANO EUROPEO

POTENTIAL BIOCONTROL OF NATIVE ENDOPHYTIC FUNGI AGAINST *AEGORHINUS SUPERCILIOSUS* (GUÉRIN) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) ASSOCIATED TO EUROPEAN HAZELNUT.

Palabras índice adicionales: Control; entomopatógenos; bioplaguicida; *Corylus avellana*; cabrito del frambueso.

RESUMEN

El avellano europeo es un frutal de interés comercial y por esto en Chile su cultivo se ha incrementado en los últimos años. Sin embargo, este no está exento de plagas como *Aegorhinus superciliosus*. En este estudio, se evaluó la capacidad de colonización endofítica de 15 cepas de hongos de los géneros *Beauveria*, *Purpureocillium* y *Metarhizium* en avellano europeo Cv Tonda di Giffoni y su capacidad para controlar adultos de *A. superciliosus*. Solo tres cepas colonizaron el interior de las plantas de avellano correspondiendo a RGM 2396 y RGM 2250 de *Beauveria* y RGM 1523 de *Purpureocillium*, con porcentajes de colonización de 6,67 %, 1,67 % y 21,61 % respectivamente. Estas cepas se seleccionaron para el bioensayo de control de adultos de *A. superciliosus* obteniéndose un 100% con RGM 2396 y RGM 2250 mientras que RGM 1523 registró un 90 % de mortalidad. Finalmente, se realizó un bioensayo de fagodisuasión donde se seleccionaron hojas de plantas inoculadas con las dos cepas de *Beauveria* anteriormente mencionadas que mostraron efecto antialimentario sobre adultos de *A. superciliosus*, con un 33,14 % menos de área foliar consumida respecto al tratamiento control. Se concluye que las cepas nativas de hongos endófitos colonizan tejidos de avellano europeo Cv Tonda di Giffoni y presentan capacidad como agentes entomopatógenos y fagodisuasivos contra adultos de *A. superciliosus*.

SUMMARY

The European hazelnut is a fruit tree of commercial interest and for this reason its cultivation in Chile has increased in recent years. However, this is not free of pests such as *Aegorhinus superciliosus*. In this study, the endophytic colonization capacity of 15 fungal strains of the genera *Beauveria*, *Purpureocillium* and *Metarhizium* in European hazel Cv Tonda di Giffoni and their ability to control adults of *A. superciliosus* were evaluated. Only three strains colonized the interior of the hazelnut plants corresponding to RGM 2396 and RGM 2250 of *Beauveria* and RGM 1523 of *Purpureocillium*, with colonization percentages of 6.67%, 1.67% and 21.61% respectively. These strains were selected for the control bioassay of *A. superciliosus* adults, obtaining 100% with RGM 2396 and RGM 2250 while RGM 1523 recorded 90% mortality. Finally, a phagodeterrent bioassay was carried out where leaves from plants inoculated with the two previously mentioned *Beauveria* strains that showed an antifeedant effect on adults of *A. superciliosus* were selected, with 33.14% less leaf area consumed compared to the control treatment. It is concluded that native strains of endophytic fungi colonize tissues of European hazel Cv Tonda di Giffoni and have the capacity as entomopathogenic and phagodeterrent agents against adults of *A. superciliosus*.

INTRODUCCIÓN

La explosión demográfica de la última década ha llevado a la búsqueda de nuevos alimentos capaces de satisfacer los requerimientos de la población; sin embargo, la actividad agrícola intensiva asociada a la incidencia de plagas, conlleva al aumento en la utilización de prácticas poco amigables para el ambiente (Reyes – Palomino *et al.*, 2022). Entre estas se encuentra el uso de plaguicidas sintéticos, cuyos compuestos activos son capaces de acrecentar los efectos del cambio climático y alterar la inocuidad alimentaria (Tognelli *et al.*, 2016).

En Chile, el cultivo de frutales tiene gran relevancia económica, debido a su gran potencial para producir alimentos de alto valor tanto comercial como nutricional. Uno de estos frutales recientemente introducido en el país es el avellano europeo (*Corylus avellana*), debido a que el fruto del avellano presenta características importantes en cuanto a su capacidad nutricional ya que en 100 g de este fruto seco

están compuestos por 15 g de proteína, 61 g de grasas insaturadas, 17 g de hidratos de carbono y 0,5 g de fibra; además de otros componentes como ácido oleico, antioxidantes y minerales como calcio, fósforo y magnesio (De La Senc, 2016). Además de su valor nutricional, el precio del avellano ha alcanzado niveles atractivos en el mercado internacional.

A nivel global, el avellano europeo proyecta un crecimiento significativo, siendo Turquía el país con mayor volumen producido, alcanzando un 80 % de la producción mundial (Grau, 2009). Por su parte, Chile en el año 2019 presentó una producción de 1.015 t (ODEPA, 2019), cantidad que aumentó en 2022 de 5.101 t (ODEPA, 2022), correspondiendo al 3,0 % de la producción mundial y quedando catalogado como el productor de mayor envergadura en el hemisferio sur de este fruto seco. Para el año 2021 las ventas por exportación de este fruto fueron de \$247.113 millones de USD (ODEPA, 2021) a nivel país, razón por la que se ha visto un aumento en la superficie plantada con este frutal.

El avellano europeo comenzó a difundirse en Chile en los años 90, principalmente en la zona centro y centro sur. Los primeros huertos se introdujeron con material vegetal importado desde Italia, principalmente de los cultivares Tonda Gentile delle Langhe y Tonda di Giffoni con sus respectivos polinizadores (Ellena, 2013). La superficie con producción de avellano europeo para el año 2019 fue de 24.436 ha (ODEPA, 2019), aumentando el año 2022 a 36.393 ha, siendo las regiones de Maule, La Araucanía y Ñuble las mayores productoras de este fruto (ODEPA, 2022).

La etapa de establecimiento de este frutal es afectada por una serie de insectos plaga, destacando entre ellos el chinche pardo (*Leptoglossus chilensis* (Spinola) (Hemíptera: Coridae), el pulgón del avellano (*Myzocallis coryli* (Goeze) (Hemíptera: Aphididae)) y el cabrito del frambueso (*Aegorhinus superciliosus*) (Coleóptera: Curculionidae)) (Agrichile, 2019), este último de gran importancia por el daño causado a los árboles.

Aegorhinus superciliosus (Guérin) (Coleóptera; Curculionidae) se ubica principalmente en el cono sur de América y en Chile, entre la región de O'Higgins y Los Lagos (Parra *et al.*, 2009). La hembra ovipone en zonas cercanas al cuello de

la planta (Carrillo *et al.*, 2001) y los huevos tardan entre 28 a 35 días en eclosionar (Aguilera *et al.*, 2018). Las larvas se caracterizan por tener una poderosa mandíbula capaz de cortar y triturar madera (Parra *et al.*, 2009), produciendo daño al perforar las raíces y cuello de las plantas, provocando una senescencia prematura, caída de hojas y bajo vigor (Cisternas y France, 2017); además su control se dificulta debido a que las larvas no son alcanzadas por los insecticidas. Esta fase es la más prolongada y variable en la vida del insecto, tomando entre 289 y 428 días, representando un 86 % de su ciclo (Ellena *et al.*, 2012). El estado adulto se alimenta de amentos y brotes jóvenes de avellano europeo, consumiendo corteza y provocando anillados que pueden llevar al quiebre de las ramillas por efecto del viento (Ellena *et al.*, 2012).

El control de este insecto es de suma importancia ya que su daño puede provocar la muerte de las plantas, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para evitar el impacto de este insecto en los huertos. Entre estos se encuentran prácticas culturales (Agrichile, 2019) y el control químico con insecticidas sintéticos (Ellena *et al.*, 2012) que es el más utilizado por los agricultores. Para determinar si es necesario aplicar insecticidas se debe realizar monitoreos constantes en el huerto y actualmente el umbral de daño económico de esta es de 2 insectos – planta, por lo que se vuelve prioritario realizar aplicaciones de insecticidas para el control de *A. superciliosus*. Entre los compuestos utilizados se encuentran insecticidas de amplio espectro como Bull (gama – cihalotrina, piretroide) y Belenus 30 WG (Indoxacarb, oxadiazinas) (Agrichile, 2019), este último prohibido para su uso en el año 2022. Sin embargo, a pesar de su efectividad, los ingredientes activos de estos insecticidas también son capaces de dañar al ser humano (Badii y Varela, 2008), lo cual sumado a su alta residualidad y persistencia en el ambiente limitan su uso (Aguilera *et al.*, 2009). Además, las larvas de esta especie se resguardan y alimentan al interior de las plantas (Parra *et al.*, 2009), por lo que los insecticidas no presentan efectividad sobre ellas. Es por esta razón que la agricultura está modificando sus métodos y optando por el control biológico.

El control biológico se basa en la utilización de organismos vivos o sustancias que estos producen, permitiendo reducir los efectos negativos causados por una

plaga en un cultivo y buscando limitar el uso de agroquímicos (Ellena *et al.*, 2012). En este tipo de organismos vivos se encuentran los hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos son de gran importancia en los agroecosistemas por su capacidad natural de regular las poblaciones de insectos, característica que depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero (Díaz *et al.*, 2006); además de ser utilizados como bio - plaguicidas en agricultura orgánica y, en consecuencia, una alternativa a los insecticidas sintéticos (Litwin *et al.*, 2020). A diferencia de bacterias y virus entomopatógenos que necesitan puntos específicos de ingreso, el hongo es capaz de ingresar al organismo a través de la cutícula del insecto (Islam *et al.*, 2021). Sin embargo, una de las desventajas de estos hongos es su susceptibilidad a los rayos UV y a la baja humedad ambiental (Vega, 2018), lo que disminuye su efectividad.

Estudios recientes han demostrado que estos organismos no solo tienen la capacidad de ser patógenos de insectos, sino que también desempeñan funciones adicionales en la naturaleza, entre las que se encuentra su capacidad como endófitos (Jaber y Ownley, 2018, Barra-Bucarei *et al.*, 2020). Los hongos endófitos entomopatógenos son en su mayor parte ascomicetes (Arnold, 2007), los cuales residen en el interior de un hospedero sin causar daño aparente (Bascom-Slack *et al.*, 2012) colonizando diferentes tejidos, proporcionando beneficios en términos de supervivencia (Fardella *et al.*, 2014) y promoción de crecimiento (Mantzoukas y Eliopoulos, 2020), entre otros. Estos hongos están muy extendidos en el reino vegetal, formando conexiones con una amplia variedad de organismos (Vega, 2018) y brindando protección secundaria contra plagas (Hartley y Gange, 2009) y presentando diferentes efectos contra ella, como el anti alimentario debido a la producción de metabolitos tóxicos para algunos insectos (Kaur *et al.*, 2013). Esta interacción endófito-huésped también sugiere que este grupo de microorganismos no son solamente oportunistas, sino que lograron una adaptación evolutiva simbiótica entre ellos (Fontana *et al.*, 2021).

Actualmente se conoce cerca de trecientas mil especies de plantas, las cuales son anfitrionas de una o más especies de estos hongos (Selim, 2012), y que además se han reportado en diversos cultivos de importancia económica (Bamisile

et al., 2018). Considerando lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de colonización endofítica de diferentes cepas de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Purpureocillium* en avellano europeo, su capacidad de bio-control contra adultos de *A. superciliosus* y el efecto anti alimentario como consecuencia de la presencia de endófitos.

MATERIALES Y METODOS

Establecimiento del estudio

La investigación se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Bioinsumos de INIA Quilamapu (CeNBI) en Chillán, región de Ñuble, Chile.

Las cepas de *Beauveria* spp., *Purpureocillium* sp. y *Metarhizium anisopliae* se colectaron en diferentes zonas de Chile y se encontraban almacenadas en el banco genético de INIA Quilamapu. Los detalles de cada cepa, especie y localidad de colecta se indican en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Cepa, especie y locación de extracción de los inóculos utilizados en la presente investigación.

N°	Código	Especie	Lugar de colecta
1	RGM 2248	<i>Beauveria peruviansis</i>	Santa Bárbara, región del Biobío, Chile.
2	RGM 2249	<i>Beauveria peruviansis</i>	Región de Los Lagos, Los Lagos, Chile.
3	RGM 2396	<i>Beauveria peruviansis</i>	Región del Maule, Molina, Chile.
4	RGM 2250	<i>Beauveria peruviansis</i>	Región de la Araucanía, Lago Icalma, Chile.
5	RGM 657	<i>Beauveria peruviansis</i>	Puerto Ibañez, Región de Aysén, Chile.
6	RGM 2362	<i>Beauveria bassiana</i>	Región de Valparaíso, Isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández, plazoleta Yunque.

Tabla 1. Cepa, especie y locación de extracción de los inóculos utilizados en la presente investigación (continuación).

7	JFD1_6C1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región de Valparaíso, Isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández, plazoleta Yunque.
8	JFD1_61	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región de Valparaíso, Isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández, mirador cerca de Peralillo.
9	RGM 3237	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región del Maule, RN Los Queules, Chile.
10	RGM 3263	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región del Maule, San clemente, Chile.
11	RGM 3264	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región del Maule, Vilches Alto, Chile.
12	RGM 392	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región de Valparaíso, Isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández.
13	RGM 1746	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Región de Valparaíso, Quillota, Chile
14	RGM 1523	<i>Purpureocillium</i> sp.	Región del Biobío, puente n°7 camino a Concepción, Chile.
15	RGM 1598	<i>Purpureocillium</i> sp.	Región del Biobío, Lago Lanalhue, Chile.

Bioensayo de colonización endófito

En macetas de 20 L de volumen se colocó 15 L de sustrato sin esterilizar, consistente en una mezcla de compost, perlita, turba y vermiculita en una relación 1:1:1:0,5. En estas se establecieron plantas de avellano cultivar Tonda di Giffoni obtenidas de un vivero mediante reproducción *in vitro*. Las plantas se regaron con 2 L de agua, tres veces por semana y se dividieron en 16 tratamientos con seis repeticiones cada uno. A continuación, se sembraron conidios de las cepas obtenidas del Banco de Recursos Genéticos Microbianos de INIA en placas de Petri de 8 cm con medio Agar Papa Dextrosa (APD) Difco™. Estas cepas se incubaron por 10 días a 24 °C en una cámara de crecimiento en obscuridad absoluta. Terminando el periodo de incubación las placas se mantuvieron por 3 días a temperatura ambiente y fotoperiodo de 12:12 Hrs con el fin de estimular la producción de conidios. Al finalizar el periodo de estrés, se prepararon

suspensiones de cada cepa con agua destilada estéril más Tween 80 (0,001 %) y a continuación, se contabilizó la concentración de conidios, ajustándolo a 1×10^7 mL⁻¹, con una cámara de Neubauer.

Se emplearon 15 mL de una suspensión con conidios de cada hongo que se preparó en vasos precipitados de 100 mL. A continuación, se marcaron hojas al azar en diferentes puntos de la planta y posteriormente, con un algodón estéril se aplicaron 2 mL de la suspensión en el has y envés. Al terminar la aplicación las plantas se ubicaron en un sombreadero, separadas por cepa aplicada y manteniendo el riego de 2 L de agua de pozo sin tratar tres veces por semana durante 15 días.

Luego de este periodo se extrajo material vegetal (hojas) desde las plantas inoculadas que se lavaron con agua potable para eliminar las impurezas. Luego, en un gabinete de bioseguridad se desinfectó el material sumergiendo las estructuras en etanol al 70 % por 15 segundos, en hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 3 minutos y nuevamente en etanol al 70 % por 15 segundos para, finalmente, enjuagar los trozos tres veces en agua destilada estéril por 1 minuto cada vez. A continuación se colocaron en papel absorbente estéril para su secado y se cortaron diez trozos de 5 mm de lado que, posteriormente se colocaron en placas de Petri de 8 cm de diámetro con Agar Noble (1 g de *Difco*TM *Agar Noble* por 100 mL de agua destilada) más Cloranfenicol (0,025 g L⁻¹) (Barra-Bucarei *et al.*, 2020). La revisión de las placas se realizó a los 15, 30, 45 y 60 días registrando la presencia de micelio derivado desde el material vegetal.

Bioensayos de actividad insecticida sobre *Aegorhinus superciliosus*.

Los adultos de *A. superciliosus* se colectaron en huertos de avellano en la comuna de Chillán, Chile (36.6066° S 72.1034° O), en un radio de 40 km. Los insectos recolectados se depositaron en recipientes de contención previamente desinfectados. Se les administró un sustrato de hidratación consistente en algodón esterilizado humedecido con 10 mL de agua destilada estéril y se suministró alimento consistente en ramillas frescas de avellano lavadas con agua potable para eliminar impurezas.

Los insectos pasaron por un periodo de aclimatación de dos días en los

respectivos recipientes y a las 48 horas se desinfectaron sumergiéndolos en agua potable por cinco segundos, posteriormente en hipoclorito de sodio al 0,5 % por tres segundos, para finalmente enjuagarlos dos veces en agua destilada estéril por tres segundos. Terminando el proceso de desinfección, los insectos se depositaron en recipientes cubiertos con papel absorbente estéril para su secado.

Los inóculos se obtuvieron como se describió en el bioensayo anterior. Las cepas se seleccionaron dependiendo de su capacidad de colonización sobre las plantas de avellano, siendo estas RGM 2396, RGM 2250 del género *Beauveria* y RGM 1523 del género *Purpureocillium*.

Se sembraron conidios de las cepas seleccionadas en placas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (APD) Difco™ que se incubaron por 10 días a 24 °C en una cámara de crecimiento en oscuridad absoluta. Terminando este periodo de incubación las placas se retiraron y colocaron por 3 días a temperatura ambiente ($20 \pm 5^{\circ}\text{C}$) con un fotoperiodo de 12 h y 12 h de oscuridad con el fin de estimular la producción de conidios. Al finalizar el periodo de estrés, se prepararon suspensiones de cada cepa con 50 mL agua destilada estéril y Tween 20 (0,01 %) y se contabilizó la concentración de conidios, ajustándolo a $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, con una cámara de Neubauer.

Se prepararon cámaras para los insectos post inoculación consistentes en cajas de cultivo vegetal magenta previamente desinfectadas con una fuente de hidratación y alimento, correspondientes a un algodón estéril humedecido con 10 mL de agua destilada estéril y tres cortes de hoja fresca de avellano europeo de 9 cm² cada uno.

Posteriormente los insectos nuevamente se lavaron con agua potable con el fin de eliminar impurezas para después ser desinfectados por inmersión de 3 s en hipoclorito de sodio al 0,5 % y finalmente enjuagados por 5 s en agua destilada estéril. Los insectos se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron en las cajas de cultivo vegetal magenta. A continuación, los insectos fueron inmersos individualmente en la suspensión con conidios por 5 s, luego se secaron en papel absorbente estéril y finalmente se colocaron en recipientes, siendo separados en tres tratamientos aplicados con las cepas mencionadas y un tratamiento control

aplicado solo con agua destilada, con diez repeticiones por cada tratamiento. Los tratamientos se revisaron diariamente hasta cumplir 13 días según una adaptación de la metodología de Santiago *et al.* (2024) registrando insectos muertos y la presencia de micelio.

Bioensayo capacidad fago-disuasiva.

Las cepas se seleccionaron dependiendo de su capacidad de colonización en plantas de avellano europeo y su capacidad de esporulación, siendo elegidas las cepas de *Beauveria* RGM 2396 y RGM 2250. Se utilizaron plantas previamente inoculadas con las cepas mencionadas y los ejemplares de *A. superciliosus* se recolectaron en huertos aledaños a la zona de Tanilvoro, región de Ñuble (36°42'26"S 71°50'28"O).

Los insectos se desinfectaron sumergiéndolos en agua potable por 5 s, posteriormente en hipoclorito de sodio al 0,5 % por tres segundos y finalmente enjuagados dos veces en agua destilada estéril por tres segundos. Luego, se colocaron en recipientes previamente desinfectados con un punto de hidratación consistente en un trozo de algodón humedecido con 10 mL de agua destilada estéril, pero sin fuente de alimento.

Se recolectaron hojas frescas de avellanos previamente inoculadas con las cepas seleccionadas que se lavaron con agua potable para eliminar impurezas que, posteriormente se cortaron en trozos de 9 cm² y depositaron en papel absorbente para su secado. Se dispusieron tres cortes de hoja de 9 cm² en cada caja magenta para, posteriormente, depositar un insecto en su interior. Las cajas se separaron en cuatro tratamientos con seis repeticiones cada uno. La evaluación final se realizó a las 48 h evaluando el área consumida de las hojas por cada insecto utilizando el software ImageJ.

Análisis estadístico

Todos los bioensayos se realizaron con un diseño experimental completamente al azar. En el análisis estadístico se compararon los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. En el bioensayo de capacidad de colonización y control de *A. superciliosus* se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) debido a que los datos no cumplieron la

prueba de normalidad. Finalmente, el bioensayo de capacidad de fagodisuasión se analizó utilizando comparaciones de medias con la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (F-LSD) ($P < 0,05$). No se utilizó el factor de corrección de Abbott (1925) en el bioensayo de control debido a que la mortalidad de los insectos en el control fue menor al 5,0 %. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo colonización endofítica

De las 15 cepas evaluadas, de los tres géneros de hongos entomopatógenos, solo dos de ellas presentaron capacidad de colonización endofítica en plantas de avellano, correspondiendo a los géneros *Beauveria* y *Purpureocillium*. Las cepas de *Metarhizium* JFD1_6C1, JFD1_61, RGM 3237, RGM 3263, RGM 3264, RGM 392 y RGM 1746 no lograron colonizar los tejidos de las plantas, por lo que quedaron descartadas para las siguientes evaluaciones. Sin embargo, existen estudios que demuestran la capacidad de este género de formar relaciones endofíticas con especies de importancia agrícola presentando un patrón de colonización sistémico (Stone y Bidochka, 2020). Además, estudios realizados por Mwamburi (2021) demostraron la capacidad de cepas de *Metarhizium* para persistir en el interior de la planta y conferir capacidad de control sobre algunas plagas como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Por su parte, las cepas de *Beauveria* RGM 2396 y RGM 2250, lograron colonizar el interior del tejido foliar, mientras que RGM 2248, RGM 2249, RGM 657 y RGM 2362 fueron descartadas ya que no presentaron colonización endofítica. Finalmente, solo la cepa de *Purpureocillium* RGM 1523 presentó colonización endofítica en los tejidos de las hojas del avellano con un patrón de colonización localizado.

Analizando el porcentaje de colonización de las cepas que lograron establecerse como endofíticas se observa que se presentaron resultados variados entre especies. Como se describe en la Tabla 2, la cepa RGM 1523 del género *Purpureocillium* presentó el mayor porcentaje de colonización, con 21,61 %. El género *Beauveria* con la cepa RGM 2250 tuvo un 1,67 % mientras que la cepa RGM 2396 registró un

6,7 % de colonización. Sin embargo, al realizar la prueba de Kruskal – Wallis no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 2. Porcentaje (%) de colonización endofítica en *Corylus avellana* de cepas endófitas de hongos entomopatógenos.

Cepa	Género	Colonización (%)
RGM 2396	<i>Beauveria</i>	6.67a
RGM 2250	<i>Beauveria</i>	1.67a
RGM 1523	<i>Purpureocillium</i>	21.61a

*Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Kruskal – wallis ($P \leq 0,05$).

La colonización de las cepas que mostraron capacidad endófitas coincide con el comportamiento demostrado por los géneros estudiados en diferentes investigaciones. En el caso de *Purpureocillium* concuerda con Kashanian *et al.* (2021), quienes buscando endófitos en *C. avellana* encontraron un total de 791 hongos endófitos en diferentes tejidos de la planta, donde el género *Purpureocillium* aparece como endófito de hojas. En cuanto a *Beauveria*, varios estudios señalan la capacidad de este hongo para establecerse como endófito en especies vegetales de importancia agronómica como tomate (Barra-Bucarei *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020) y maíz (Russo *et al.*, 2019) entre otros. Además, está demostrada su capacidad de colonizar especies leñosas como el arándano (Hu y Bidochka, 2019), por lo que la colonización en avellano es acorde al comportamiento de este hongo.

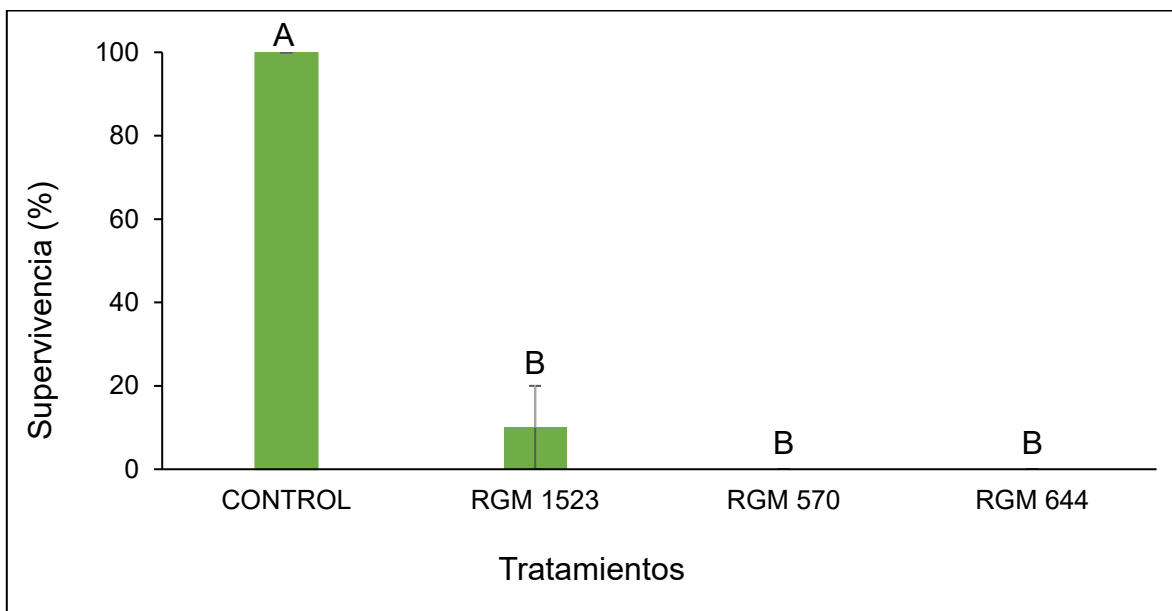
Bioensayos de capacidad de control de *Aegorhinus superciliosus*.

En este bioensayo se utilizaron las cepas RGM 2396 y RGM 2250 de *Beauveria* y la cepa RGM 1523 de *Purpureocillium* debido a que demostraron la capacidad de colonizar tejido de las plantas de avellano.

Con relación a la supervivencia de los insectos, como se puede observar en la Figura 1, se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos, presentando el control un 100 % de insectos vivos, por lo que no fue necesario aplicar el factor de

corrección de Abbott (1925). La cepa de *Purpureocillium* RGM 1523 presentó un 90 % de mortalidad mientras que las cepas de *Beauveria* mostraron un 100% de insectos muertos sin registrar diferencia significativa entre los tratamientos con las cepas endófitas ($P > 0.05$).

Figura 1. Insectos vivos a los 13 días tras un tratamiento por inmersión con cepas RGM 1523 (*Purpureocillium*), RGM 2250 (*Beauveria*). y RGM 2396 (*Beauveria*).

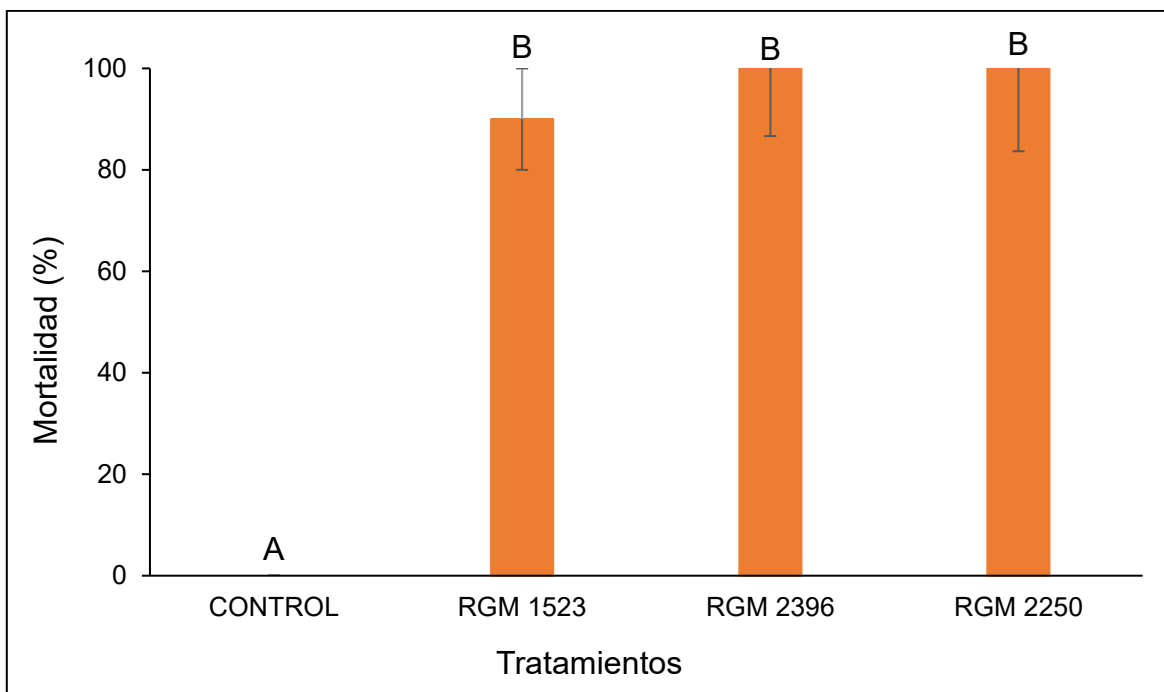


*Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Kruskal – Wallis ($P \leq 0,05$).

En cuanto al porcentaje de mortalidad, la cepa de *Purpureocillium* presentó un 90 %, concordando con Toksöz *et al.*, (2018), quienes utilizaron la cepa conocida como TR1 de la especie *Purpureocillium lillacinum* en el control de insectos de la familia *Curculionidae*, *Xylosandrus germanicus* (Blanford) y *Xyleborus dispar* (fabricius), considerados plaga en avellano europeo en Turquía, lograron una mortalidad de 75,40 % utilizando una suspensión de conidios a una concentración de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, que es similar a la utilizada en este estudio. Por su parte las dos cepas de *Beauveria* que alcanzaron un 100 % de mortalidad, coinciden con Ahmed y Freed (2021), quien utilizó una cepa identificada como Bb-01 de *B. bassiana* para el control del curculiónido *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), registró porcentajes de mortalidad cercanos al 90 % a los 7 días después de la aplicación, valores

similares a los obtenidos en el presente estudio. Lo anterior confirma el potencial de este género para controlar insectos de la familia curculionidae y posiblemente la actividad insecticida esté relacionada con la habilidad del hongo para producir metabolitos tóxicos con capacidad insecticida, causando parálisis e inmunosupresión (Farooq y Freed, 2018).

Figura 2. Mortalidad a los 13 días de *Aegorhinus superciliosus* tratados por inmersión con cepas RGM 1523 (*Purpureocillium*), RGM 2250 (*Beauveria*) y RGM 2396 (*Beauveria*).

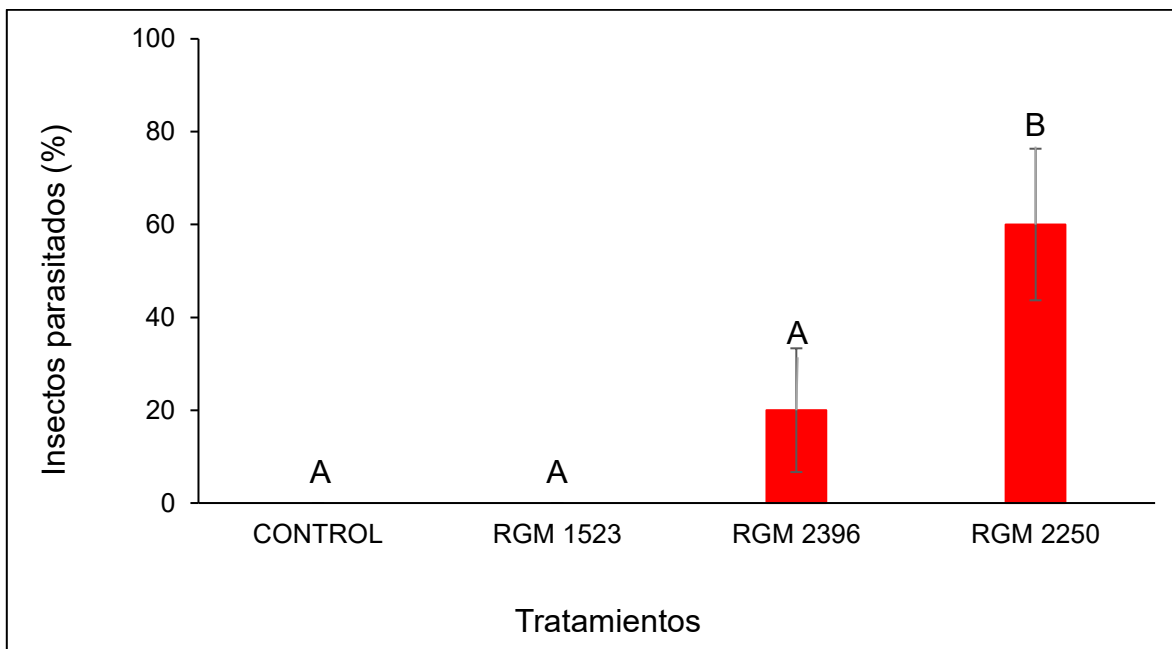


*Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Kruskal – Wallis ($P \leq 0,05$).

En cuanto al porcentaje de insectos parasitados, que corresponde a los individuos que presentan micosis, como se observa en la Figura 2, *Purpureocillium* no presentó individuos afectados, lo que podría deberse a la falta de compatibilidad de los componentes químicos extracelulares por parte del hospedero. Estos compuestos son los encargados de liberar la formación de estructuras de colonización y la producción de enzimas capaces de realizar la lisis celular del insecto (Singh *et al.*, 2017). Lo anterior podría indicar que el mecanismo de control del insecto está asociado principalmente a la acción de metabolitos tóxicos (Thi *et*

al., 2023). Las cepas de *Beauveria* mostraron comportamientos diferentes como se observa en la figura 3, presentando la cepa RGM 2396 un 20 % y RGM 2250 un 60 % de parasitismo respectivamente. Este comportamiento podría deberse a las diferentes enzimas extracelulares secretadas por el género *Beauveria*, entre las que se encuentran proteasas, glicosidasas, lipasas y quitinasas entre otras, que están implicadas en la colonización del hongo sobre el insecto (Altamira *et al.*, 2022). Estas enzimas despliegan una señal al encontrar nutrientes críticos en la hemolinfa, promoviendo el crecimiento de las hifas y logrando colonizar completamente para, posteriormente emerger en forma de micelio y producir conidios (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2016).

Figura 3. Parasitismo a los 13 días de *Aegorhinus superciliosus* tratados por inmersión con cepas RGM 1523 (*Purpureocillium*), RGM 2250 (*Beauveria*) y RGM 2396 (*Beauveria*).



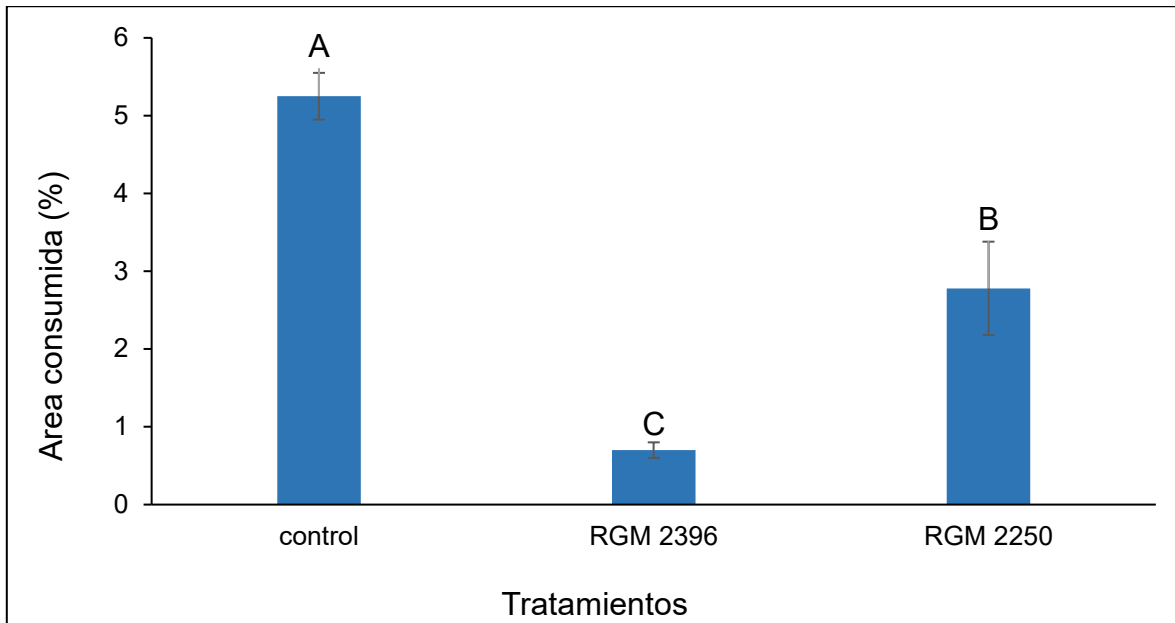
*Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba de Kruskal – Wallis ($P \leq 0,05$).

Bioensayo capacidad fago-disuasiva

En este bioensayo se evaluaron las cepas del género *Beauveria* RGM 2396 y RGM 2250. El tratamiento control presentó la mayor cantidad de área consumida, con un 5,25 % mientras que la cepa RGM 2396 presentó un promedio de 0,7 %. A su vez,

la cepa RGM 2250 tuvo un 2,78 % de área consumida.

Figura 4. Área consumida por adultos de *Aegorhinus superciliosus* en hojas inoculadas con las cepas RGM 2396 y RGM 2250 de *Beauveria* spp.



*Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamientos según prueba LSD – Fisher ($P \leq 0,05$).

Las cepas del género *Beauveria* al colonizar tejidos vegetales presentan la capacidad de producir metabolitos que afectan principalmente la biología de los insectos, pudiendo desencadenar respuestas tanto humorales como celulares (Pedrini, 2022). En este grupo se encuentra beauvericina, que presenta actividad mitotóxica y neurotóxica (Patočka, 2016) y bassiacridinas, que es una proteína que al ingresar al insecto provoca procesos necróticos en diferentes tejidos, causando la muerte del huésped (Quesada-Moraga y Vey, 2004; Mckinnon *et al.*, 2016), entre otros. Además, se han reportado especies del género *Beauveria* con la habilidad de inducir respuestas en las plantas al colonizarlas, activando sistemas de defensa, llevando a estas a producir metabolitos capaces de defenderlas del ataque de plagas y enfermedades (Wang *et al.*, 2023). Estudios realizados por Berestetskiy y Hu (2021) demostraron que esta especie fúngica presenta antecedentes de actividad antialimentaria contra insectos de la familia curculionidae, específicamente gorgojos del género *Sitophilus*, debido a la producción de compuestos orgánicos

volátiles capaces de producir repelencia al momento de alimentarse de la planta colonizada, por lo que este comportamiento podría explicar la respuesta de *A. superciliosus* en las hojas de avellano colonizadas por el hongo (figura 4). Cabe destacar que la respuesta inducida por la colonización de *Beauveria* en el tejido de la planta depende de la cepa aplicada (Qin *et al.*, 2021), razón por la cual se puede obtener una diferencia significativa entre los tratamientos a pesar de ser hongos de una misma especie. Sin embargo, no está claro el compuesto específico que causó el efecto de fagodisuasión y que debería ser identificado en estudios posteriores.

El uso de cepas de hongos endófitos entomopatógenos podría ser una alternativa complementaria e innovadora para el control de *Aegorhinus* spp. a utilizar en huertos frutales, aunque es necesario identificar el mecanismo responsable de este efecto en los insectos estudiados.

CONCLUSIONES

- 1- Las cepas de *Purpureocillium* RGM 1523 y de *Beauveria* RGM 2396 y RGM 2250 presentan la capacidad de colonizar el tejido de las hojas de avellano europeo Cv Tonda di Giffoni.
- 2- Las cepas de *Purpureocillium* RGM 1523 y de *Beauveria* RGM 2396 y RGM 2250 presentan propiedades entomopatógenas contra adultos de *Aegorhinus superciliosus*.
- 3- Las cepas RGM 2396 y RGM 2250 presentan efecto anti alimentario sobre adultos de *Aegorhinus superciliosus* al colonizar tejido de plantas de avellano europeo Cv Tonda di Giffoni.

REFERENCIAS

1. Agrichile. 2019. Boletín técnico: Manejo integrado de plagas. [en línea]. Agrichile, Chile. <<https://agrichile.cl/noticias/boletin-tecnico-manejo-integrado-de-plagas-mip/>>. [Visitado en mayo 2023].
2. Aguilera, A., R. Galdames, M. Ellena, A. González y P. Sandoval. 2018. Protección del cultivo plagas, enfermedades y desordenes fisiológicos del Avellano Europeo. Temuco: Colección Libros INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 36.
3. Aguilera, A., V. Zaampezzi, X. Araneda, C. Klein, R. Rebolledo. 2009. Efectividad

- de la azadirachtina en la inhibición de la embriogenesis de *Aegorhinus superciliosus* (guérin) (coleóptera: curculionidae). *Idesia*. 27 (1): 47-55.
4. Ahmed, R., y S. Freed. 2021. Virulence of *Beauveria bassiana* Balsamo to red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian journal of biological pest control*. 31(1): 5.
 5. Altamira, F., M. Arias-Aravena, J. Ling, N. Real, P. Correa, C. Gonzáles-Rosales, y E. Tapia. 2022 genomic and experimental analysis of the insecticidal factors secreted by the entomopathogenic fungus *beauveria pseudobassiana* RGM 2184. *Journal of fungi*. 8(3): 253.
 6. Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21(2-3): 51-66.
 7. Badii, M. y S. Varela. 2008. Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. *Culcyt*. 5(28): 1-18.
 8. Bamisile, B. S., C. K. Dash, K. S. Akutse, R. Keppanan, O.G. Afolabi, M. Hussain, M. Qasim, y L. Wang. 2018. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant Growth Promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. *Microbiological Research*. 217(1): 34-50.
 9. Barra-Bucarei, L., A. France Iglesias, M. Gerding González, G. Silva Aguayo, J. Carrasco-Fernández, J. F. Castro, y J. Ortiz Campos. 2020. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two Solanaceae crops. *Microorganisms*. 8(1): 65.
 10. Bascom-Slack, C. A., A. E. Arnold, S. A. Strobel. 2012. Student-directed discovery of the plant microbiome and its products. *Science*. 338 (6106): 485–486.
 11. Berestetskiy, A., y Q. Hu. 2021. The Chemical Ecology Approach to Reveal Fungal Metabolites for Arthropod Pest Management. *Microorganism*. 9(7): 1379.
 12. Carrillo, R. H. Perez, M. Neira. 2001. Comportamiento de ovoposición de *Aegorhinus superciliosus* (guérin) (coleóptera: curculionidae). *Revista UACH*. 30(1): 6.
 13. De La Senc, G. C. 2016. Guías Alimentarias para la Población Española. *Nutrición Hospitalaria*. 33(8): 1-48
 14. Di Rienzo, J.A, F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada, y C. Robledo. 2011. *InfoStat Version 2011*; Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina. 8: 195–199.
 15. Díaz, M. P., A. F. Macías, S. R. Navarro, y M. De La Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12): 856-860.
 16. Ellena, M., A. González, y A. Aguilera. 2012. Manejo integrado de plagas subterráneas en Avellano europeo (con especial referencia a *Aegorhinus superciliosus* y *A. nodipennis*). *Biblioteca INIA*. Temuco. Chile.

17. Ellena, M. 2013. Avellano europeo: establecimiento y formación de la estructura productiva. pp. 9-48. Boletín INIA N°278. INIA Carillanca. Chile.
18. Fardella, C., R. Oses, C. Torres – Díaz, M. Molina – Montenegro. 2014. Hongos antárticos como herramienta para la reintroducción de especies nativas en zonas áridas. Bosque. Vol 35 (2): 235-239.
19. Farooq, M. y S. Freed. 2018. Insecticidal activity of toxic crude proteins secreted by entomopathogenic fungi against musca domestica L. (Diptera: Muscidae). Kuwait journal of science. 45(2): 2307-4108.
20. Fontana, D. C., S. De Paula, A. G. Torres, V. H. M. De Souza, S. F. Pascholati, D. Schmidt, y D. D. Neto. 2021. Endophytic fungi: biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. Pathogens. 10(5): 570.
21. Grau, P. 2009. Manual de avellano europeo. pp. 9-46. Boletín INIA N°195. INIA Quilamapu. Chile.
22. Hartley. S y A. Gange. 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. Annu. Rev. Entomol. 54: 323-42
23. Hu, S., y M. Bidochka. 2019. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. Journal of Applied Microbiology. 130(2): 570-581.
24. Islam, W., M. Adnan, A. Shabbir, H. Naveed, Y. S. Abubakar, M. Qasim, M. Tayyab, A. Noman, M. S. Nisar, K. A. Khan, y H. Ali. 2021. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. Microbial Pathogenesis. 159: 105-122.
25. Jaber, L. R. y B. H. Ownley. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. Biological control. 116: 36-45.
26. Kashanian, A., N. Panjekeh y F. Taliei. 2021. Investigating Diversity and Spatial Distribution of Endophytic Fungi in Hazelnut (*Corylus avellana*) in its Different Habitats of Iran. DOAJ. 10(40): 53-69.
27. Kaur, H. P., B. Singh, A. Kaur, y S. Kaur. 2013. Antifeedent and toxic activity of endophytic *Alternaria alternata* against tobacco caterpillar *Spodoptera litura*. Journal of Pest Science. 86(3): 543-550.
28. Litwin, A., M. Nowak, y S. Różalska. 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 19(1): 23-42.
29. Mantzoukas, S. y P. A. Eliopoulos. 2020. Endophytic entomopathogenic fungi: a valuable biological control tool against plant pests. Applied sciences. 10(1): 360.
30. McKinnon, A., S. Saari, M. Moran – Diez, N. Meyling, M. Raad, T. Glare. 2016. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *BioControl*. 62: 1-17.

31. Mwamburi, L. A. 2021. Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in two tomato varieties. *Egyptian Journal Of Biological Pest Control*. 31(1): 7.
32. ODEPA. 2019. Boletín de fruta, Julio 2019. En: <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71138/Catastro-Fruticola-Nuble-2019.pdf>. Visitado en mayo de 2022.
33. ODEPA. 2021. Matriz detallada; comercio exterior. En: <https://aplicativos.odepa.gob.cl/matriz.do>. Visitado en marzo 2023.
34. ODEPA. 2022. Catastro frutícola abril 2022. https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71983/Catastro_Fruticola_NUBLE.pdf. Visitado en marzo 2023
35. Ortiz-Urquiza, A. y N. O. Keyhani. 2016. Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. *Adv Genet*. 94(1): 165-249
36. Parra, L., M. Mutis, A. Aguilera, R. Rebolledo y A. Quiroz. 2009. Estado de conocimiento sobre el cabrito del frambueso (CF), *Aegorhinus superciliosus* (guérin) (coleptera: cuculionidae). *Idesia*. 27(1): 57-65.
37. Patočka, J. 2016. Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Vojenské Zdravotnické Listy*. 85(2): 80-88.
38. Pedrini, N. 2022. The Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Shows Its Toxic Side within Insects: Expression of Genes Encoding Secondary Metabolites during Pathogenesis. *Journal Of Fungi*. 8(5): 488.
39. Quesada-Moraga, E., y A. Vey. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*. 108(4): 441-452.
40. Qin, X., X. Zhao, S. Huang, J. Deng, X. Li, Z. Luo, y Y. Zhang. 2021. Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. *Pest Management Science*. 77(4): 2007-2018.
41. Reyes - Palomino, S. E. y D. M C. Ccoa. 2022. Efectos de la agricultura intensiva y el cambio climático sobre la biodiversidad. *Revista de investigaciones altoandinas*. 24(1): 53-64.
42. Russo, M. L., A. C. Scorsetti, M. F. Vianna, M. N. Cabello, N. Ferreri, y S. A. Pelizza. 2019. Endophytic Effects of *Beauveria bassiana* on Corn (*Zea mays*) and Its Herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 10(4): 110.
43. Santiago, M. R., M. Félix, C. Badaró – Pedroso, G. Gioz. 2024. Efeitos da exposição da joaninha asiática *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinelidae) ao bioinsecticida IBCB 66 em condições de laboratório. *CEP*. 4014: 900.
44. Selim, K. A. 2012. Biology of endophytic fungi. *Current Research in*

- Environmental y Applied Mycology (Journal of Fungal Biology). 2(1): 31-82.
45. Silva, A. C. L., G. A. Silva, P. H. N. Abib, A. T. Carolino y R. I. Samuels. 2020. Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. CABI Agriculture And Bioscience. 1(1): 1
 46. Singh D., T. K. Raina y J. Singh. 2017. Entomopathogenic fungi: an effective bio - control agent for management of insect populations naturally. J Pharm Sci Res. 9(6): 830–839
 47. Stone, L. B. L., y M. Bidochka. 2020. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. Applied Microbiology And Biotechnology. 104(23): 9935-9945.
 48. Thi, H. N., K. Le, Y. P. Thien, N. D. T. Nguyen y A. Duy. 2023. Insecticidal activity of isolated *Purpureocillium lilacinum* PL1 against whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) on cassava plantations in southern Vietnam. Egyptian Journal Of Biological Pest Control. 33(1): 44.
 49. Tognelli, M. F., C. Lasso, C. Bota-Sierra y L. Jiménez-Segura. 2016. Estado de conservación y distribución de la biodiversidad de agua dulce en los andes tropicales. UICN. Gland. Suiza.
 50. Toksöz, S., E. Oksal, I. Saruhan y I. Kepenekci. 2018. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Purpureocillium lilacinum* TR1 against ambrosia beetles *Xylosandrus germanicus* (Blandford) and *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Mun. Ent. Zool. 13(2): 471-481.
 51. Vega, F. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia. 110(1): 4-30.
 52. Wang, X., G. Yan, W. Liu, H. Chen, Q. Yuan, Z. Wang y H. Liu. 2023. Endophytic *Beauveria bassiana* of Tomato Resisted the Damage from Whitefly *Bemisia tabaci* by Mediating the Accumulation of Plant-Specialized Metabolites. Journal Of Agricultural and Food Chemistry. 71(36): 13244-13254.