



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**  
**AGRONOMÍA**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

---

**“EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL DE *Euxesta stigmatias* EN MAZORCAS DE MAÍZ (*Zea mays*), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, CAMPUS SALACHE – LATACUNGA – COTOPAXI 2022”**

---

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Ingeniero Agrónomo

**Autor:**  
Caiza Jarrin Andy Mauricio

**Tutora:**  
Toapanta Gallegos Diana Elizabeth, Ing. Mg.

**Co - tutora:**  
Llanos Proaño Tannya Elizabeth, Ing. Mg.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Agosto 2022**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Andy Mauricio Caiza Jarrin, con cédula de ciudadanía No. 1718931528, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Evaluación de dos cepas de *Beauveria bassiana* para el control de *Euxesta stigmatias* en mazorcas de maíz (*Zea mays*), bajo condiciones controladas”, siendo la Ingeniera Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 25 de agosto del 2022

Andy Mauricio Caiza Jarrin  
Estudiante  
CC: 171893528

Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.  
Docente Tutora  
CC: 1002749800

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CAIZA JARRIN ANDY MAURICIO**, identificado con cédula de ciudadanía **1718931528** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero PhD. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA.** - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Evaluación de dos cepas de *Beauveria bassiana* para el control de *Euxesta stigmatias* en mazorcas de maíz (*Zea mays*), bajo condiciones controladas”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

Inicio de la carrera: Octubre 2018 – Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril 2022 – Agosto 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 3 de junio del 2022

Tutora: Ingeniera Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

Tema: “Evaluación de dos cepas de *Beauveria bassiana* para el control de *Euxesta stigmatias* en mazorcas de maíz (*Zea mays*), bajo condiciones controladas”

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA.** - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

1. La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
2. La publicación del trabajo de grado.
3. La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

4. La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
5. Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 25 días del mes de agosto del 2022.

Andy Mauricio Caiza Jarrin  
**EL CEDENTE**

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, PhD.  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

**“EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL DE *Euxesta stigmatias* EN MAZORCAS DE MAÍZ (*Zea mays*), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, CAMPUS SALACHE – LATACUNGA – COTOPAXI 2022”**, de Caiza Jarrin Andy Mauricio, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 25 de agosto del 2022

Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos Mg.

**DOCENTE TUTORA**

CC: 1002749800

## **AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Caiza Jarrin Andy Mauricio, con el título del Proyecto de Investigación: “EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL DE *Euxesta stigmatias* EN MAZORCAS DE MAÍZ (*Zea mays*), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, CAMPUS SALACHE – LATACUNGA – COTOPAXI 2022”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 25 de agosto del 2022

Lector 1 (presidente)  
Ing. Emerson Jácome Mogro, Mg.  
CC: 0501974703

Lector 2  
Ing. Fabián Troya Sarzosa, PhD.  
CC: 0501645568

Lector 3  
Ing. Edwin Chancusig Espín, PhD.  
CC: 0501148837

## **AGRADECIMIENTO**

En la presente investigación quiero agradecer en primer lugar a Dios, a la Virgen de Guadalupe por iluminar mi camino, por brindarme salud, fortaleza y sabiduría para alcanzar mis metas propuestas y a mi abuelita por darme sus bendiciones desde el cielo.

A mis padres, por su apoyo incondicional, paciencia y comprensión quienes son un pilar fundamental en mi vida e inspiración. De igual manera agradezco a mi hermana por acompañarme en todo momento, brindándome todas sus fuerzas para cumplir este sueño anhelado.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi y Facultad CAREN por permitirme continuar con mis estudios para terminar con mi formación profesional.

A mi tutora de proyecto de titulación Ing. Diana Toapanta quien, con su conocimiento y experiencia me guió en todas las fases de la investigación. Al laboratorio de la Carrera de Agronomía, en especial a la Ing. Tannya Llanos, quien con sus conocimientos apoyo a la construcción de la parte metodológica de la presente investigación.

A mi enamorada por su apoyo, paciencia en todo momento ayudándome a crecer como persona y profesional.

Andy Mauricio Caiza Jarrin

## **DEDICATORIA**

A Dios y la Virgen de Guadalupe, por brindarme fortaleza de seguir luchando por mis sueños.

A mi madre Norma Jarrin y a mi abuelita María Nicolasa Carua, quienes con amor y sacrificio me supieron ayudar, apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida, con sus consejos e ideas que fueron lo que estimularon y aportaron incondicionalmente para la culminación de la carrera.

Mauri

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO: “EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL DE *Euxesta stigmatias* EN MAZORCAS DE MAÍZ (*Zea mays*), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, CAMPUS SALACHE – LATACUNGA – COTOPAXI 2022”**

**AUTOR:** Caiza Jarrin Andy Mauricio

**RESUMEN**

Una de las plagas que ocasiona severos daños a la mazorca del maíz es la mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*). Los daños empiezan desde el consumo de estilos, el ápice de la tusa y los granos en desarrollo, reduciendo rendimientos en la etapa reproductiva (R3) lechoso (tierno). La finalidad de la investigación fue determinar la mejor cepa de *Beauveria bassiana* y la mejor concentración para el control de la mosca de los estigmas en estadio larval, bajo condiciones controladas. Planteando una alternativa de control para reducir pérdidas de producción en la etapa reproductiva (R3) lechoso (tierno). La investigación se lo realizó en el Laboratorio de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi, aplicando un arreglo factorial de AxB+1 adicional implementado en un DBCA con cuatro repeticiones, donde el Factor A corresponde a *Beauveria bassiana* nativa (costa y sierra) y el Factor B corresponde a las concentraciones ( $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$  esporas/ml), obteniendo un total de 28 unidades experimentales con 15 larvas de *Euxesta stigmatias* por cada unidad experimental. Las variables determinadas fueron porcentaje de mortalidad empleando *Beauveria bassiana* y porcentaje de granos dañados. Los resultados obtenidos se analizaron en el programa InfoStat y tras obtener en el ADEVA resultados significativos, se realizó la prueba de Tukey al 5% para la obtención de los diferentes rangos de significancia. El resultado para el porcentaje de mortalidad se determinó que el tratamiento tres (T3) que corresponde a la aplicación de *Beauveria bassiana* nativa sierra a una concentración de  $10^9$  esporas /ml alcanzó el 100% de mortalidad en comparación con el adicional que no registró larvas muertas. Con respecto a la variable porcentaje de granos dañados, se obtuvo que el tratamiento tres (T3) que corresponde a la aplicación de *Beauveria bassiana* nativa sierra a una concentración  $10^9$  esporas/ml obtuvo un 2,28% de granos dañados en comparación con el adicional (T7) que obtuvo un 10,11% de granos dañados. Por lo tanto, se concluye que la mejor cepa fue *Beauveria bassiana* nativa sierra para el control de larvas de *Euxesta stigmatias*, además, se estableció que la mejor concentración fue  $10^9$  esporas/ml.

**Palabras claves:** *Euxesta stigmatias*, *Beauveria bassiana*, concentración, maíz, mortalidad

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**  
**FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES**

**THEME:** "Evaluation of two strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Euxesta stigmatias* in corn cobs (*Zea mays*), under controlled conditions, Campus Salache - Latacunga – Cotopaxi 2022"

**AUTHOR:** Caiza Jarrin Andy Mauricio

**ABSTRACT**

One of the pests that causes severe damage to the corn ear is the stigma fly (*Euxesta stigmatias*). The damage starts from the consumption of styles, the apex of the ear and the developing kernels, reducing yields in the reproductive stage (R3) milky (tender). The purpose of the research was to determine the best strain of *Beauveria bassiana* and the best concentration for the control of the stigma fly in larval stage, under controlled conditions. The aim was to propose an alternative control to reduce production losses in the reproductive stage (R3) milky (tender). The research was carried out in the Agronomy Laboratory of the Technical University of Cotopaxi, applying an additional AxB+1 factorial arrangement implemented in a DBCA with four replications, where Factor A corresponds to native *Beauveria bassiana* (coast and sierra) and Factor B corresponds to the concentrations ( $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$  spores/ml), obtaining a total of 28 experimental units with 15 larvae of *Euxesta stigmatias* per experimental unit. The variables determined were percentage of mortality using *Beauveria bassiana* and percentage of damaged grains. The results obtained were analyzed in the InfoStat program and after obtaining significant results in the ADEVA, the Tukey test at 5% was performed to obtain the different ranges of significance. The result for the percentage of mortality was determined that treatment three (T3), which corresponds to the application of *Beauveria bassiana* native sierra at a concentration of  $10^9$  spores/ml, reached 100% mortality compared to the additional treatment that did not record dead larvae. With respect to the variable percentage of damaged grains, it was obtained that treatment three (T3) which corresponds to the application of *Beauveria bassiana* native sierra at a concentration of  $10^9$  spores/ml obtained 2.28% of damaged grains compared to the additional (T7) which obtained 10.11% of damaged grains. Therefore, it is concluded that the best strain was *Beauveria bassiana* native sierra for the control of *Euxesta stigmatias* larvae, in addition, it was established that the best concentration was  $10^9$  spores/ml.

**Keywords:** *Euxesta stigmatias*, *Beauveria bassiana*, concentration, corn, mortality.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xvi
CAPÍTULO I	1
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	3
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
4.1. Beneficiarios Directos	3
4.2. Beneficiarios Indirectos	4
5. PROBLEMÁTICA	4
6. OBJETIVOS	4
6.1. Objetivo General	4
6.2. Objetivos Específicos	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE ACTIVIDADES EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
CAPÍTULO II	7

8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	7
8.1. El maíz	7
8.1.1. Generalidades del maíz	7
8.1.2. Importancia del maíz en el mundo.	7
8.1.3. Importancia del maíz en el Ecuador.	8
8.1.4. Clasificación taxonómica del maíz ( <i>Zea mays</i> ).	8
8.1.5. Estadíos vegetativos y reproductivos	8
8.1.6. Principales plagas del maíz.	9
8.1.6.1. Mosca de los estigmas ( <i>Euxesta stigmatias</i> )	9
8.1.6.2. Gusano cogollero ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	9
8.1.6.3. Barrenador del tallo ( <i>Diatraea sp.</i> )	9
8.1.6.4. Gusano elotero o de la mazorca ( <i>Heliothis zea</i> )	10
8.1.6.5. Gusanos cortadores ( <i>Agrotis sp.</i> )	10
8.2. Mosca de los estigmas	10
8.2.1. Generalidades	10
8.2.2. Origen y distribución	10
8.2.3. Clasificación taxonómica de las larvas de la mosca de los estigmas ( <i>Euxesta stigmatias</i> )	10
8.2.4. Daños que ocasiona a la mazorca	12
8.2.5. Métodos de control	12
8.2.5.1. Control cultural	12
8.2.5.2. Control químico	13
8.2.5.3. Control biológico	13
8.3. Hongos entomopatógenos.	13
8.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	13
8.3.2. Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> .	14
8.3.3. Descripción microscópica	14

8.3.4. Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	14
8.3.5. Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i>	15
8.3.5.1. Adhesión	15
8.3.5.2. Germinación	15
8.3.5.3. Penetración	15
8.3.5.4. Producción de toxinas	16
8.3.5.5. Muerte del insecto	16
8.3.5.6. Multiplicación y crecimiento	16
8.3.5.7. Penetración del interior hacia el exterior	17
8.3.5.8. Producción de nuevas unidades reproductivas	17
CAPÍTULO III	18
9. HIPÓTESIS	18
10. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	18
10.1. Localización del ensayo	18
10.1.1 Croquis	18
10.2. Tipo de Investigación	19
10.2.1. Experimental	19
10.2.2. Cual-quantitativa	19
10.3. Modalidad básica de investigación	19
10.3.1. Observación científica	19
10.3.2. Cuantitativa	19
10.3.3. De laboratorio	19
10.3.4. Inductivo	19
10.3.5. Bibliográfica Documental	19
10.4 Técnicas de la investigación	20
10.4.1. Observación de laboratorio	20
10.4.2. Registro de datos	20

10.5. Materiales, equipos y reactivos	20
10.5.1. Material biológico	20
10.5.2. Materiales de laboratorio	20
10.5.3. Equipos	21
10.5.4. Reactivos	21
10.6. Diseño Experimental	22
10.7. Unidad Experimental	22
10.8. Factores en estudio	22
10.9. Tratamientos en estudio	22
10.10. ADEVA	23
10.11. Variables en estudio	23
10.12. Manejo del Experimento	24
10.12.1. Método de reactivación del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en un medio de Insecto	Agar 24
10.12.2. Método de multiplicación del hongo	25
10.12.3. Fase de conteo y elaboración de la solución madre.	26
10.12.3.1. Solución madre	27
10.12.3.2. Conteo de esporas	28
10.12.3.3. Elaboración de las concentraciones	28
10.12.4. Fase de aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en la plaga a evaluarse.	30
10.12.4.1. Colecta y Preservación de las larvas	30
10.12.4.2. Implementación del bioensayo	31
10.12.4.3. Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> nativas.	32
10.13. Datos a Evaluar.	32
10.13.1. Porcentajes de larvas muertas:	32
10.13.2. Porcentaje de granos dañados.	33
10.14. Análisis Estadístico	33

10.15. Prueba de Patogenicidad.	33
CAPÍTULO IV	34
11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	34
11.1. Análisis de mortalidad de larvas de <i>Euxesta stigmatias</i>	34
11.2. Análisis de Porcentaje de Granos Dañados.	39
12. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES Y ECONÓMICOS)	44
12.1. Impactos Técnicos.	44
12.2. Impactos Sociales.	45
12.3. Impactos Ambientales.	45
12.4. Impactos Económicos.	45
CAPÍTULO V	46
13. CONCLUSIONES	46
14. RECOMENDACIONES	46
15. BIBLIOGRAFÍAS	47
16. ANEXOS	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Actividades en relación a los objetivos planteados. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica del maíz.....	8
<b>Tabla 3.</b> Estadíos reproductivos y vegetativos. ....	9
<b>Tabla 4.</b> Taxonomía de las larvas de la mosca de los estigmas.....	11
<b>Tabla 5.</b> Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> .....	14
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> . ....	15
<b>Tabla 7.</b> Tratamientos en estudios de acuerdo al diseño experimental establecido. ....	23
<b>Tabla 8.</b> Esquema del ADEVA.....	23
<b>Tabla 9.</b> Variables a evaluar. ....	24

<b>Tabla 10.</b> ADEVA para la variable porcentaje de mortalidad de <i>Euxesta stigmatias</i> en estadio larval.....	35
<b>Tabla 11.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos en la mortalidad de larvas de <i>Euxesta stigmatias</i> .....	35
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.....	36
<b>Tabla 13.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor B.....	37
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y Factor B.....	38
<b>Tabla 15.</b> ADEVA para la variable de porcentaje de granos dañados.....	40
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos en los granos dañados.....	40
<b>Tabla 17.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.....	41
<b>Tabla 18.</b> Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para el Factor B.....	42
<b>Tabla 19.</b> Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y Factor B.....	43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Ciclo de vida de la mosca de los estigmas.....	11
<b>Gráfico 2.</b> Grano de choclo atacado por larva de <i>Euxesta stigmatias</i> .....	12
<b>Gráfico 3.</b> Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i> .....	16
<b>Gráfico 4.</b> Larva de <i>Euxesta stigmatias</i> , atacado por <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
<b>Gráfico 5.</b> Croquis donde está ubicado el proyecto.....	18
<b>Gráfico 6.</b> Porcentaje de mortalidad total de los tratamientos.....	34
<b>Gráfico 7.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.....	37
<b>Gráfico 8.</b> Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para el Factor B.....	38
<b>Gráfico 9.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y el Factor B.....	39
<b>Gráfico 10.</b> Porcentaje de granos dañados total de los tratamientos.....	39
<b>Gráfico 11.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.....	42
<b>Gráfico 12.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor B.....	43
<b>Gráfico 13.</b> Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y el Factor B.....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Hoja de vida de la docente tutora .....	51
<b>Anexo 2.</b> Hoja de vida del Lector 1 .....	54
<b>Anexo 3.</b> Hoja de vida del Lector 2.....	55
<b>Anexo 4.</b> Hoja de vida del Lector 3.....	56
<b>Anexo 5.</b> Reactivación de la cepa de <i>Beauveria bassiana</i> del Laboratorio de Agronomía ....	57
<b>Anexo 6.</b> Multiplicación del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> en el laboratorio .	57
<b>Anexo 7.</b> Elaboración de la solución madre.....	58
<b>Anexo 8.</b> Elaboración de las concentraciones .....	59
<b>Anexo 9.</b> Colecta y Preservación de las larvas.....	60
<b>Anexo 10.</b> Implementación del bioensayo .....	60
<b>Anexo 11.</b> Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en cada unidad experimental .....	61
<b>Anexo 12.</b> Registro de Mortalidad de larvas de <i>Euxesta stigmatias</i> y Granos dañados .....	62
<b>Anexo 13.</b> Larvas muertas por el efecto de <i>Beauveria bassiana</i> .....	62
<b>Anexo 14.</b> Comprobación Re aislando <i>Beauveria bassiana</i> sobre larvas infectadas.....	63
<b>Anexo 15.</b> Presupuesto general .....	64
<b>Anexo 16.</b> Protocolo de laboratorio para el manejo del hongo entomopatógeno .....	66
<b>Anexo 17.</b> Aval de traducción.....	76

## CAPÍTULO I

### 1. INFORMACIÓN GENERAL

**Título:**

“EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DE *Beauveria bassiana* PARA EL CONTROL DE *Euxesta stigmatias* EN MAZORCAS DE MAÍZ (*Zea mays*), BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, CAMPUS SALACHE – LATACUNGA – COTOPAXI 2022”

**Fecha de inicio:**

Abril 2022

**Fecha de finalización:**

Agosto 2022

**Lugar de ejecución:**

El Campus Experimental Salache se encuentra ubicado en el barrio Eloy Alfaro, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi.

**Unidad Académica que auspicia:**

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN)

**Carrera que auspicia:**

Carrera de Agronomía

**Proyecto de Investigación vinculado:**

Producción de bioinsumos y biocontroladores como alternativa para la producción agrícola de alimentos sanos, saludables y sin contaminantes.

**Equipo de Trabajo**

Tutora: Ing. Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

Autor: Andy Mauricio Caiza Jarrin

Lector 1: Ing. Emerson Jácome Mogro, Mg.

Lector 2: Ing. Fabián Troya Sarzosa, PhD.

Lector 3: Ing. Edwin Chancusig Espín, PhD.

**Área de Conocimiento.**

Agricultura, Silvicultura y Pesca.

**Línea de investigación:**

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

La biodiversidad forma parte intangible del patrimonio nacional: en la agricultura, en la medicina, en actividades pecuarias, incluso en ritos, costumbres y tradiciones culturales. Esta línea está enfocada en la generación de conocimiento para un mejor aprovechamiento de la biodiversidad local, basado en la caracterización agronómica, morfológica, genómica, física, bioquímica y usos ancestrales de los recursos naturales locales. Esta información será fundamental para establecer planes de manejo, de producción y de conservación del patrimonio natural

**Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Caracterización de la biodiversidad

**Línea de vinculación**

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y gestión para el desarrollo humano y social.

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

En la sierra ecuatoriana uno de los cultivos de mayor importancia económica es el de maíz (*Zea mays*), cuya producción alcanza 1, 358,626 toneladas métricas. Sin embargo, el cultivo es atacado por las plagas tales como los gusanos de la mazorca *Heliothis zea* y *Euxesta stigmatias*, que atacan durante el periodo de floración y formación del grano. Durante la etapa de reproducción del maíz (R3 lechoso) el ataque de plagas es común, siendo las larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias* una plaga que al no ser controlada a tiempo alcanzan niveles muy altos de infestación causando pérdidas directamente en la productividad. En la presente investigación se realizó el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para controlar *Euxesta stigmatias* en estado larval bajo condiciones controladas, mediante ensayos en laboratorio.

Esta investigación constó de tres fases:

- 1.- Fase de laboratorio: Se realizó la reactivación y la multiplicación de *Beauveria bassiana*.
- 2.- Fase de conteo: En esta fase se realizó el conteo de esporas y la elaboración de la solución madre a base de *Beauveria bassiana*.
- 3.- Fase de aplicación: Se aplicó las suspensiones a diferentes concentraciones obtenidas a partir de la solución madre sobre las mazorcas de maíz, para posteriormente evaluar la mortalidad de las larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias*.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La presente investigación está enfocada en proporcionar un control biológico a los productores de maíz, para el control de larvas de *Euxesta stigmatias* mismas que al no ser controladas terminan alcanzando niveles de infestación del ochenta al noventa por ciento en la fase reproductiva R3 lechoso (tierno). Para solucionar este problema los agricultores han optado por el uso intensivo de insecticidas de síntesis químico como: los piretroides, clorpirifos, metal paratión y endosulfán. Según el INEC para el año 2020, el uso de insecticidas en el país fue de setenta y nueve por ciento, mientras que, el uso de insumos orgánicos para el mismo año fue de cuatro por ciento.

Por tal motivo se ha planteado el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como un mecanismo de control biológico, para insectos del orden Díptera, para combatir y erradicar esta plaga, evitando así, pérdidas económicas.

Además, al utilizar *Beauveria bassiana* se contribuye al cuidado del medio ambiente y se disminuye el riesgo de contaminación a la salud de los seres humanos y de los animales por residuos de los insecticidas de síntesis químico.

### **4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

#### **4.1. Beneficiarios Directos**

Los beneficiarios directos son los productores de maíz de la provincia de Cotopaxi, y productores a nivel nacional.

## 4.2. Beneficiarios Indirectos

Los beneficiarios indirectos son los estudiantes y docentes de la Carrera de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

## 5. PROBLEMÁTICA

La producción del cultivo de maíz a nivel nacional alcanza 1.3 millones de quintales anuales, de la cual depende toda la población ecuatoriana, ya que es uno de los principales rubros agrícolas de elevado consumo, tanto humano, como de materia prima para las industria alimenticia y elaboración de alimentos para animales. Entre las principales plagas registradas en el cultivo de maíz dentro de nuestro país que afectan a la calidad del grano, se presenta la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias*, el gusano de la mazorca, *Helicoverpa zea*, el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* y el barrenador del tallo *Diatraea spp.*

Se han realizados estudios en Panamá de infestaciones a nivel del grano en mazorcas de maíz en estado lechoso (maíz nuevo), donde se han encontrado larvas de un díptero alimentándose del mismo y reduciendo considerablemente la calidad y valor comercial de las mazorcas. Análisis similares de esta plaga se han realizado en países como Argentina, Ecuador, Chile, Perú y Brasil, donde se considera una plaga principal asociada al género de *Euxeta stigmatias* (Goyal et al, 2011)

Estudios realizados por el INIAP en el año 2002 las pérdidas ocasionadas por la mosca de los estigmas en la mazorca de maíz en estado lechoso (tierno) en la Región Sierra del país, se encontraba entre el 80 – 90%. Mientras que, en la provincia de Pichincha, otro estudio realizado por (Arenillo, 2017), determina que el porcentaje de daño que ocasiona la mosca de los estigmas esta entre 60 – 71%.

Frente a esta situación surge la necesidad de realizar estudios basados en el control biológico para determinar la incidencia de esta plaga en diferentes zonas productoras de maíz a nivel del país, para establecer medidas futuras para su manejo y control.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo General

Evaluar dos cepas de *Beauveria bassiana* para el control de *Euxesta stigmatias* en mazorcas de maíz (*Zea mays*), bajo condiciones controladas.

## 6.2. Objetivos Específicos

- Determinar la mejor cepa de *Beauveria bassiana* para el control de larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias*.
- Establecer la mejor concentración para el control de la mosca de los estigmas en estadio larval.

## 7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE ACTIVIDADES EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

**Tabla 1.** Actividades en relación a los objetivos planteados.

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADO	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Determinar la mejor cepa de <i>Beauveria bassiana</i> para el control de larvas de la mosca de los estigmas ( <i>Euxesta stigmatias</i> ).	Reactivación de una cepa de <i>Beauveria bassiana</i> del laboratorio de Agronomía.	Cepa activa de <i>Beauveria bassiana</i> .	- Cajas Petri con el hongo activo.
	Multiplicación de <i>Beauveria bassiana</i> .	Subcultivos del hongo entomopatógeno.	- Cajas Petri con <i>B. bassiana</i> .
	Elaboración de las suspensiones madres del hongo entomopatógeno.	Dos suspensiones madre de <i>Beauveria bassiana</i> .	- Conteo de esporas en la cámara de Neubauer. - Fotografías.
Establecer la mejor concentración para el control de la mosca de los estigmas en estadio	Elaboración de diferentes concentraciones a partir de las suspensiones madre	Suspensiones a diferentes concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> ( $10^5$ , $10^7$ , $10^9$ )	- Fotografías. - Conteo de esporas

larval.	mediante conteo de esporas.		
	Implementación del ensayo y Aplicación de suspensiones a diferentes concentraciones en las unidades experimentales.	Unidades experimentales rociadas con el hongo entomopatógeno en diferentes concentraciones.	- Fotografías - Libreta de laboratorio
	Conteo de larvas post-aplicación.	Cálculo del porcentaje de mortalidad aplicando la fórmula $%M_c = (X - Y/X) * 100$	- Número de larvas muertas. - Tabla de resultados
	Conteo de granos dañados.	Cálculo del porcentaje de granos dañados aplicando la fórmula $%M_c = (X - Y/X) * 100$	- Número de granos dañados. - Tabla de resultados

## CAPÍTULO II

### 8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

#### 8.1. El maíz

##### 8.1.1. Generalidades del maíz

El maíz (*Zea mays*) tuvo su origen en Mesoamérica (México y Guatemala), sus primeras apariciones fueron entre los años 8000 y 600 AC posiblemente a lo largo del acantilado occidental de México Central o del Sur, a 500 km de la Ciudad de México, por lo cual no hay dudas que el maíz tiene origen americano, (Acosta, 2009).

El Ecuador cuenta con una superficie de 361.347 ha de maíz duro cultivado, una producción de 1215.192 Tm con rendimientos de 3,68 Tm/ha en promedio. Las provincias con mayor producción a nivel nacional son Los Ríos 56 % Guayas 19 %, Manabí 10 % y Loja 8%, (Brito, 2018).

En la sierra del Ecuador el cultivo de maíz (*Zea mays L.*) es uno de los más importantes debido a la superficie sembrada y al papel que cumple en la seguridad y soberanía alimentaria, al ser un componente básico de la dieta de la población rural. La superficie sembrada de maíz suave para el año 2020 fue de 74 961 ha, con un promedio de 3,36 t/ha en choclo y 1,07 en grano seco, (Peñaherrera, 2020).

##### 8.1.2. Importancia del maíz en el mundo.

El maíz es el cultivo con mayor superficie sembrada y cosechada en el mundo. Además, es el más producido y consumido. Su característica distintiva es el mayor número de países participantes. Todas estas características hacen del maíz materia prima, producto procesado, tecnología para la producción de cereales y sus derivados, elementos centrales de las negociaciones entre los países y el mundo. Entre 2000 y 2008, la producción mundial de maíz creció un 39% y llegó a 822 millones de toneladas, mientras que el trigo y el arroz, los cultivos más rentables durante varios años, aumentaron solo un 15%. Otra característica del maíz es que se produce en todos los continentes. Según datos proporcionados por la FAO, hay 168 países productores de maíz y 51 países recibieron un promedio de más de un millón de toneladas en 2000/10, (MAIZAR, 2011).

### 8.1.3. Importancia del maíz en el Ecuador.

El maíz (*Zea mays L*) es uno de los cultivos más importantes para los ecuatorianos ya que su producción proporciona materia prima para la agroindustria y alimento para el pueblo. Según estadísticas de la FAO, en 2016 la superficie cultivada fue de 485.696 hectáreas, la producción fue de 1.667.704 toneladas y el rendimiento fue de 3,17 toneladas/ha-1. Actualmente, la producción nacional se enfoca principalmente en los tipos duro y suave; Según el Ministerio de Agricultura, el rendimiento promedio de maíz amarillo duro en 2015 y 2016, a partir de dos ciclos de siembra es de 5,76 ton ha-1; La mejora de los rendimientos se atribuyó principalmente a dos factores: el uso de semillas híbridas con alto potencial de rendimiento y la política de precios mínimos de apoyo a los productores, lo que incrementó significativamente los ingresos de los medianos y pequeños productores de maíz, (Caviedes, 2018).

### 8.1.4. Clasificación taxonómica del maíz (*Zea mays*).

A continuación, (Ortigoza, 2019) describe la siguiente clasificación:

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica del maíz.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliópsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Gramíneas
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

**Fuente:** (Ortigoza, 2019)

### 8.1.5. Estadíos vegetativos y reproductivos

Según (Fassio, 2011), los estadíos de un cultivo es una sucesión obligatoria de etapas en un orden irreversible. Se llama ciclo de producción al conjunto de fases que van desde la germinación de la semilla hasta la floración y formación del fruto. En el cultivo de maíz, se distinguen los estadíos Vegetativo y Reproductivo, los cuales se detallan a continuación:

**Tabla 3.** Estadíos reproductivos y vegetativos.

<b>Vegetativo</b>	<b>Reproductivo</b>
VE: Emergencia	R1: Barbas
V1: Primera hoja	R2: Ampolla
V2: Segunda hoja	R3: Lechoso
V3: Tercera hoja	R4: Pastoso
V(n): Enésima hoja	R5: Dentado
VT: Panojamiento	R6: Madurez fisiológica

**Fuente:** (Fassio, 2011)

### **8.1.6. Principales plagas del maíz.**

Para (Páliz, 2018), las principales plagas del maíz son:

#### **8.1.6.1. Mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*)**

Atacan durante el periodo comprendido entre la floración femenina y la formación del grano, reduciendo la producción y la calidad comercial.

#### **8.1.6.2. Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*)**

Es una plaga universal de gran importancia económica, cuando el clima es caliente y seco, las larvas completamente desarrolladas, que han caído al suelo antes de convertirse en pupas, empiezan a alimentarse en la base de la planta, cercenando el tallo tierno. En períodos de sequía su presencia y acción puede ser fatal.

#### **8.1.6.3. Barrenador del tallo (*Diatraea sp.*)**

El daño es causado por la larva, la cual ataca a todas las partes de la planta especialmente El tallo es el mayormente atacado, en la parte baja y a la altura de la mazorca. Las mazorcas son atacadas en el pedúnculo, la base e interior de la tuza.

#### **8.1.6.4. Gusano elotero o de la mazorca (*Heliothis zea*)**

El gusano es una de las principales especies que provoca graves daños y pérdidas económicas, afectando principalmente al cultivo de maíz en etapas de reproducción de la planta.

#### **8.1.6.5. Gusanos cortadores (*Agrotis sp.*)**

Se alimentan de las raíces y base del tallo por lo que causan la marchitez y muerte de la planta.

### **8.2. Mosca de los estigmas**

#### **8.2.1. Generalidades**

Las estigmatías del maíz (*Euxesta stigmatias*) pueden causar daños muy graves a los cultivos y pueden clasificarse como daños directos e indirectos. Algunos cultivos pueden requerir algún control durante el ciclo de crecimiento, mientras que otros no. Las operaciones residuales de control de insecticidas son efectivas y oportunas. El daño directo lo ocasiona las larvas de la mosca de los estigmas, ya que se alimenta durante su estado larvario de los granos de maíz en estado lechoso-masoso (fase reproductiva R3), donde provoca grandes daños en la mazorca desde la punta hasta la base de la misma. Por otra parte, debido a las perforaciones y a la acumulación de excremento se favorece el desarrollo de hongos patógenos que provocan la pudrición de la mazorca, (Ortega, 2014).

#### **8.2.2. Origen y distribución**

Hay más de 69 especies de *Euxesta* en América Latina, de las cuales *Euxesta stigmatias* causa el mayor daño al maíz. Entre los insectos identificados en Ecuador en 1959-1977 en colaboración con *Insect Identification and Parasite Introduction Research Branch* se localizaron *Euxesta eluta* Loew, que junto con la mariposa *Heliothis sp.*, su nivel de daño es del 93% de granos dañados, (Merino & Víctor Vázquez, 2001).

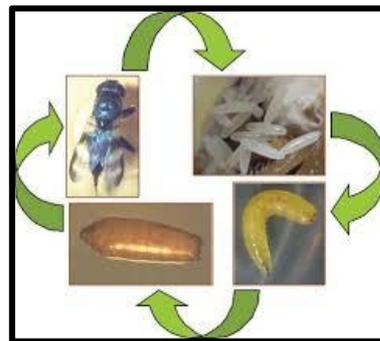
#### **8.2.3. Clasificación taxonómica de las larvas de la mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*)**

Según (PANORAMA, 2015), esta es la siguiente clasificación:

**Tabla 4.** Taxonomía de las larvas de la mosca de los estigmas.

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Díptera
Familia	Ulidiidae
Género	<i>Euxesta</i>
Especie	<i>E. stigmatias</i>

**Fuente:** (PANORAMA, 2015)

**Gráfico 1.** Ciclo de vida de la mosca de los estigmas.

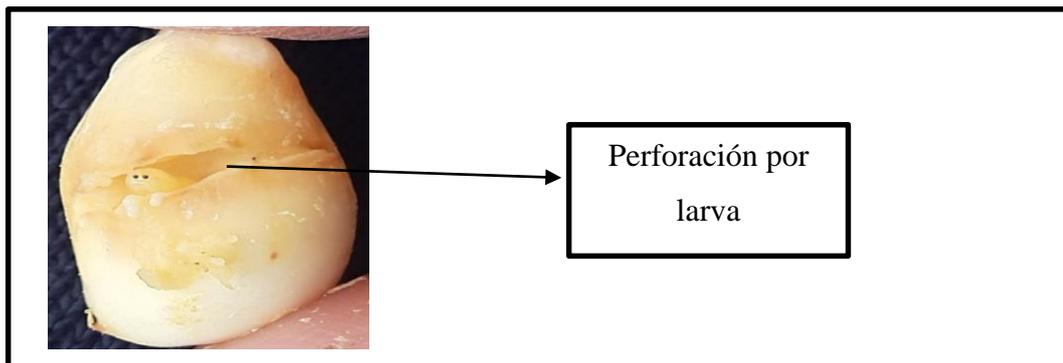
**Fuente:** (Ortega, 2014)

Para (Ortega, 2014), el mayor daño que causa el gusano de la mosca del maíz a la producción es en la etapa larval en la fase reproductiva R3 lechoso de la planta. Las larvas de *Euxesta stigmatias*, son de color blanco cremoso, de aproximadamente un 1 cm. cuando está completamente desarrollado; forma una pupa de color marrón rojizo o marrón oscuro en el surco de los estigmas. La forma adulta es una mosca de aproximadamente 0,5 centímetros de largo con alas rayadas que se deslizan rápidamente hacia los lados cuando se mueve. Estas moscas ponen huevos que presentan un color blanco, en el surco de los estigmas. Los huevos se agrupan de 2-30 huevecillos (y las hembras ovopositan hasta 95 huevecillos), presentan un color blanco hialino y poseen una forma alargada, midiendo 0.80 x 0.20 mm. La fase larval dura  $13 \pm 3$  días, son de color blanco-amarillenta, alargada con la parte apical más ancha que la posterior, alcanzando 7 mm de largo. La fase de pupa dura  $7 \pm 2$  días, presenta un color amarillo- rojizo-café oscuro, con un extremo redondo, que mide 5 x 1.3 mm.

#### 8.2.4. Daños que ocasiona a la mazorca

Las hembras ponen huevos en la mazorca tres semanas después de la polinización. Las larvas ingresan por la parte superior de la mazorca y se alimentan de los granos provocando la pérdida de la cosecha. Las larvas inmaduras pueden dañar otras partes de la mazorca, ocasionando su deformación, además debido al daño que ocasionan provocan enfermedades lo que reduce la productividad del cultivo. Esta plaga daña la mazorca de diferentes formas, la primera es mediante el daño ocasionado a los estigmas, obstruyendo con el flujo de polen e impidiendo la polinización. La segunda forma es a través del daño que causan las larvas cuando se alimentan del pericarpio de los granos de maíz, dejando la epidermis del grano, donde buscan protección. Esta plaga presenta conductas caníbales, razón por la cual en una mazorca pueden vivir de 12 a 15 larvas sin atacarse entre ellos, (PANORAMA, 2015).

**Gráfico 2.** Grano de choclo atacado por larva de *Euxesta stigmatias*.



#### 8.2.5. Métodos de control

Existen algunos métodos para controlar las plagas en los cultivos, a continuación, se mencionan los siguientes:

##### 8.2.5.1. Control cultural

(Injante & Joyo, 2010), mencionan que se debe retirar las plantas pequeñas infectadas de la emisión anterior del pistilo. Use aceite de cocina o aceite vegetal, para evitar las posturas de *Euxesta stigmatias*.

### 8.2.5.2. Control químico

Para controlar la mosca del choclo la literatura recomienda el uso de insecticidas organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoides, también usados para controlar a los insectos que chupan, mastican y minan al cultivo de maíz, (Arenillo, 2017).

### 8.2.5.3. Control biológico

(Camacho & Mundo, 2012), indican que, existen enemigos naturales de la mosca del estigma, la avispa *Spalangia spp.* (Hymenoptera: Pteromalidae), que parasitan diferentes géneros de moscas incluyendo *Euxesta*. En campo demostraron un nivel de parasitismo del 38 al 47% de pupas de moscas de este género, durante el ciclo agrícola primavera-verano. Ésta mosca puede penetrar hasta 20 cm de profundidad, cuando encuentra pupas las parasita depositando un huevo dentro de ellas y completa el desarrollo en 20 días.

## 8.3. Hongos entomopatógenos.

Los hongos son microorganismos unicelulares (levadura) o multicelulares (especies filamentosas) que consisten en células alargadas con paredes que contienen celulosa y quitina, así como otros carbohidratos y proteínas. Estas estructuras vegetativas se denominan hifas. Después de infectar con éxito se producen las estructuras reproductivas llamadas esporas o conidios, éstas son producidas asexualmente por el huésped y ayudan a propagar patógenos. Los hongos tienen una gran variabilidad genética y una amplia gama de huéspedes. Los hongos de mayor interés por su potencial como patógenos de insectos son: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Nomuraea rileyi*, *Lecanicillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Paecilomyces spp.*, *Cordyceps spp.*, y hongos del orden *Entomophthorales* (*Zoophthora*, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Neozygites*). Los órdenes de insectos que suelen ser más propensos a los hongos son *Hemiptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Orthoptera*. Los hongos entomopatógenos constituyen actualmente una alternativa para el control de insectos plaga ya que constituyen un grupo de más de 750 especies, (Moino & Sousa, 2017).

### 8.3.1. *Beauveria bassiana*

Es considerada uno de los agentes de biocontrol más efectivos en la agricultura. Se tiene una gran experiencia en la industria del control de plagas en todo el mundo. (IICA, 2015). Este

hongo entomopatógeno al entrar en contacto con el insecto plaga, penetra en su interior por las partes blandas parasitándolo y ocasionando su muerte. *Beauveria bassiana* es un hongo imperfecto que puede infectar a más de 200 especies de insectos, se caracteriza por presentarse como un polvo blanco o amarillo cremoso similar al algodón. Su epizootia es favorecida por su clima templado y húmedo, *Beauveria bassiana* tiene un amplio rango de temperatura de crecimiento de 15°C a 30°C y una humedad relativa del 90%, (CERTIS, 2022).

### 8.3.2. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*.

Según (Noboa & Quedal, 2015), ésta es la siguiente clasificación:

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*.

Reino	Fungi
División	Amastigomicotina
Sub división	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycete
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>B. bassiana</i>

**Fuente:** (Noboa & Quedal, 2015)

### 8.3.3. Descripción microscópica

Chiriboga *et al.*, (2015), menciona que *Beauveria bassiana* posee un micelio septado, con conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro, donde se producen conidios o esporas hialinas de forma redonda y ovalada de 2 a 3 micras de diámetro, que se insertan en el raquis.

### 8.3.4. Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Según (Martínez, 2010), éstas son las siguientes condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*:

**Tabla 6.** Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*.

<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
pH	Crecimiento entre 5,7 – 5,9
Temperatura	Crecimiento entre 25 – 30°C (mínimo de 10°C y máximo de 30°C)
Humedad	Alrededor del 94%
Necesidades nutricionales	Sacarosa, fuentes de carbono (glucosa, almidón, pectina) y nitrógeno (peptona).

**Fuente:** (Martínez, 2010)

### **8.3.5. Modo de acción de *Beauveria bassiana***

El ciclo de vida de este hongo consta de dos etapas: patógena y saprofita. El crecimiento fúngico se puede dividir en ocho etapas, como se describe a continuación:

#### **8.3.5.1. Adhesión**

El primer contacto de un hongo con un insecto ocurre cuando las esporas (conidios) se acumulan en la superficie del insecto.

#### **8.3.5.2. Germinación**

El conidio inicia el desarrollo del tubo germinatorio y un órgano de retención (llamado apresorio) que le permite adherirse a la superficie del insecto. Una germinación adecuada requiere una humedad relativa del 92% y una temperatura de 23 a 25°C.

#### **8.3.5.3. Penetración**

Luego de la inmovilización por mecanismo físico (presión sobre la superficie de contacto) y químico (acción de enzimas: proteasa, lipasa y quitinasa), el hongo ingresa al cuerpo del insecto a través de los tejidos blandos.

#### 8.3.5.4. Producción de toxinas

Dentro de los insectos, los hongos se ramifican y residen en las cavidades del huésped. Produce una toxina llamada *Beauvericina* que destruye el sistema inmunológico del patógeno, permitiendo que el hongo ataque todos sus tejidos. Otras toxinas liberadas son: beauvericin, beauverolides, bassianolide, isarolides, ácido oxálico y los pigmentos tenellina y bassianina, que tienen cierta actividad insecticida. La función del veneno es prevenir el ataque a las estructuras invasoras del hongo.

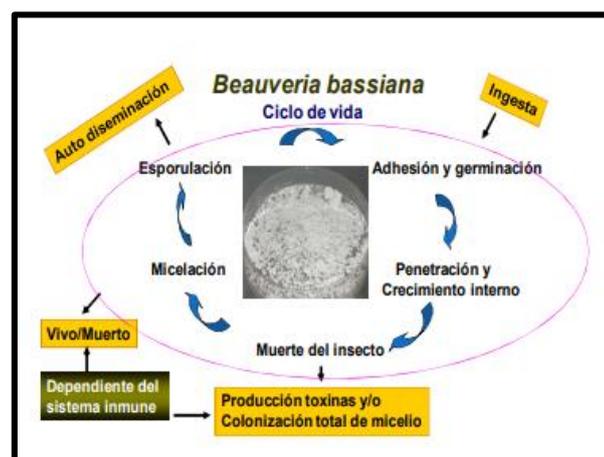
#### 8.3.5.5. Muerte del insecto

La muerte del patógeno marca el final de la fase parasitaria, por lo tanto, el comienzo de la fase saprofita.

#### 8.3.5.6. Multiplicación y crecimiento

Después de que el insecto muere, el hongo multiplica sus unidades infecciosas (micelio) y crece simultáneamente, invadiendo eventualmente todos los tejidos del insecto y volviéndose resistente a la descomposición, presumiblemente debido a los antibióticos secretados por los hongos. Después de la infección completa, el crecimiento adicional de hongos en los insectos depende de la humedad relativa y, en condiciones aptas, los insectos conservan su apariencia de momia, (INTAGRI, 2020).

**Gráfico 3.** Ciclo de vida de *Beauveria bassiana*.



**Fuente:** (INTAGRI, 2020)

### 8.3.5.7. Penetración del interior hacia el exterior

Solo cuando las condiciones ambientales lo permiten, el hongo penetra en las partes blandas de la larva y emerge.

**Gráfico 4.** Larva de *Euxesta stigmatias*, atacado por *Beauveria bassiana*.



### 8.3.5.8. Producción de nuevas unidades reproductivas

Acondicionado para crecer, comienza a formar nuevas unidades reproductivas o esporas.

## CAPÍTULO III

### 9. HIPÓTESIS

**H<sub>0</sub>**= Con la aplicación de al menos una de las concentraciones de *Beauveria bassiana* se logrará la mortalidad de las larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias*.

**H<sub>A</sub>**= Con la aplicación de al menos una de las concentraciones de *Beauveria bassiana* no se logrará la mortalidad de las larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias*.

### 10. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 10.1. Localización del ensayo

El bioensayo se ubicó en el Laboratorio de la Carrera de Agronomía, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

##### 10.1.1 Croquis

El Campus Experimental Salache, se encuentra ubicado en el barrio Eloy Alfaro, cantón Latacunga a una altura de 2730 (m s. n. m.) con 78°37'25" de longitud oeste y 00°59'55" de latitud sur.

**Gráfico 5.** Croquis donde está ubicado el proyecto.



**Fuente:** (Google Earth, 2022)

## **10.2. Tipo de Investigación**

### **10.2.1. Experimental**

Es experimental debido a que mediante un ensayo de laboratorio se analizan una o más variables independientes, para el diseño de este proyecto.

### **10.2.2. Cualitativa**

Describe sucesos complejos en su medio natural, y cuantitativa porque recogen datos cuantitativos los cuales incluyen mediciones sistemáticas además se empleará un análisis estadístico en el programa INFOSTDAD 2.0.

## **10.3. Modalidad básica de investigación**

### **10.3.1. Observación científica**

La observación científica permite indagar de manera directa del objeto de investigación.

### **10.3.2. Cuantitativa**

Permite interpretar los resultados obtenidos en el laboratorio al momento de obtener los resultados y discusiones.

### **10.3.3. De laboratorio**

La investigación ejecutada en ensayos de laboratorio, permite la recolección de datos directamente en el lugar donde se establecerá el experimento.

### **10.3.4. Inductivo**

Las conclusiones generales extraídas de las instalaciones específicas se procesaron durante la investigación.

### **10.3.5. Bibliográfica Documental**

De igual manera este estudio tendrá relación con material bibliográfico y documental que servirá de base para el contexto del marco teórico y los resultados obtenidos.

## **10.4 Técnicas de la investigación**

### **10.4.1. Observación de laboratorio**

Esta técnica permitió tener un contacto directo con el insecto plaga *Euxesta stigmatias*, utilizados dentro de la investigación, y luego se observó su comportamiento al ser inoculadas con diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana*.

### **10.4.2. Registro de datos**

Se registró los datos que se obtuvo a través de una libreta de campo, donde fueron apuntadas y ordenadas para obtener una mayor información de la investigación.

## **10.5. Materiales, equipos y reactivos**

### **10.5.1. Material biológico**

Se utilizaron cultivos puros de *Beuaveria bassiana* obtenidos previamente de aislamientos propios dentro del laboratorio de agronomía.

### **10.5.2. Materiales de laboratorio**

1. Tubos de ensayo de 15ml
2. Cajas Petri de plástico y de vidrio
3. Erlenmeyer de 250ml
4. Vasos de precipitación de 300ml
5. Frascos graduados de 500ml
6. Pipetas de plástico de 5ml
7. Pipetas volumétricas de 20 y 200  $\mu\text{L}$
8. Mechero
9. Pinzas metálicas
10. Asas metálicas
11. Gradilla
12. Papel plástico film
13. Papel aluminio
14. Papel absorbente
15. Papel Parafilm

16. Larvas de *Euxesta stigmatias*
17. Larvas de *Phyllophaga spp.*
18. Mazorcas de maíz (etapa reproductiva R3)
19. Algodón
20. Guantes estériles
21. Estilete
22. Marcador permanente
23. Mascarillas
24. Jeringuillas de 10ml
25. Miel
26. Rociadores
27. Platos desechables
28. Medias de nylon
29. Elástico
30. Cinta doble faz
31. Bisturí y porta bisturí

### **10.5.3. Equipos**

1. Cámara de Neubauer
2. Cámara de flujo laminar
3. Balanza de precisión
4. Autoclave
5. Microscopio
6. Estereoscopio
7. Incubadora
8. Vórtex
9. Cámara fotográfica
10. Agitador

### **10.5.4. Reactivos**

1. Agar Papa Dextrosa (PDA)
2. Agar Agar

3. Glucosa
4. Tween 80
5. Agua destilada
6. Antibiótico (Gentamax 180)
7. Vitaminas A y E

### **10.6. Diseño Experimental**

Se realizó un arreglo factorial de  $A \times B + 1$  adicional, implementado en un DBCA con cuatro repeticiones, donde se presentó el Factor (A) como *Beauveria bassiana* (costa y sierra), el Factor (B) como las concentraciones ( $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ ).

### **10.7. Unidad Experimental**

Cada unidad experimental constó de 15 larvas (gusanos) los cuales fueron ubicados en unas tarrinas plásticas, en las mismas donde se colocó los choclos con 15 larvas.

### **10.8. Factores en estudio**

El presente bioensayo constó de dos factores en estudio:

#### **Factor A (*Beauveria nativa*)**

- Bs = Sierra
- Bc = Costa

#### **Factor B (Concentraciones)**

- C1 =  $10^5$
- C2 =  $10^7$
- C3 =  $10^9$

### **10.9. Tratamientos en estudio**

Seguidamente, se enlista los tratamientos con su respectiva simbología utilizados en el bioensayo experimental:

**Tabla 7.** Tratamientos en estudios de acuerdo al diseño experimental establecido.

TRATAMIENTOS	<i>Beauveria bassiana (nativas)</i>	SIMBOLOGÍA	CONCENTRACIONES
T1	Sierra	BsC1	10 <sup>5</sup>
T2	Sierra	BsC2	10 <sup>7</sup>
T3	Sierra	BsC3	10 <sup>9</sup>
T4	Costa	BcC1	10 <sup>5</sup>
T5	Costa	BcC2	10 <sup>7</sup>
T6	Costa	BcC3	10 <sup>9</sup>
T7	Adicional		

**10.10. ADEVA****Tabla 8.** Esquema del ADEVA.

F de V	GL
TRATAMIENTOS	6
BLOQUES	3
FACTOR A ( <i>Beauveria</i> )	1
FACTOR B (Concentraciones)	2
FACTOR A*FACTOR B	2
Factorial vs Adicional	1
Error	18
Total	27

**10.11. Variables en estudio**

Posteriormente, se presentan las variables en estudio a evaluar dentro de la investigación.

**Tabla 9.** Variables a evaluar.

<b>Tipo de variable</b>	<b>Nombre</b>	<b>Indicador</b>	<b>Índice</b>	<b>Técnica</b>	<b>Instrumentos</b>
Dependiente	Mortalidad	Número de las larvas muertas de <i>Euxesta stigmatias</i>	% de mortalidad de larvas	Conteo	Observación directa
	Granos dañados	Número de granos dañados por mazorca	% de granos dañados	Conteo	Observación directa
Independiente	<i>Beauveria bassiana</i>	Número de esporas/ml	Suspensión de tres concentraciones 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>7</sup> , 10 <sup>9</sup>	Fórmula	Cámara de neubauer

## 10.12. Manejo del Experimento

### 10.12.1. Método de reactivación del hongo *Beauveria bassiana* en un medio de Agar Insecto

Para la reactivación del hongo se empleó la metodología utilizada por (Chiriboga, Gómez, y Garcés, 2015), donde mencionan que, se debe seleccionar insectos activos, que se encuentren vivos al momento de ser recolectados (*Phyllophaga sp.*).

A continuación, se detalla el procedimiento de esta metodología que se realizó en el Laboratorio de Agronomía:

1. Se desinfectó los insectos con hipoclorito de sodio al 0.5% en 500mL de agua destilada.

2. Se sumergió los insectos de 5 a 10 minutos.
3. Se pesó 18gr de AGAR AGAR, luego se pesa 15gr de Glucosa, después se pesa 70gr de insectos (cutzos).
4. En un vaso de precipitación de 500mL se coloca agua destilada, los 18gr de AGAR AGAR y los 15gr de Glucosa.
5. Después se coloca a los cutzos en una licuadora se añade 500mL de agua destilada y se procede a licuar.
6. Posteriormente con un cernidor o una coladera se cierne el extracto y se coloca en un vaso de precipitación de 1000mL.
7. Finalmente se traspasa a los frascos graduados 400mL del extracto para realizar el medio de cultivo AGAR INSECTO.

#### **10.12.2. Método de multiplicación del hongo**

Se utilizó la metodología empleada por (Castillo y Choquetarqui, 2012), mencionando que las muestras obtenidas a partir del AGAR INSECTO se las debe colocar en PDA realizando cortes rectangulares de 5mm con un bisturí suplementado de un antibiótico a base de Gentamicina, sellado con cinta Parafilm y finalmente este debe ser colocado dentro de la cámara de incubación.

A continuación, se detalla los pasos desarrollados y materiales utilizados para la multiplicación de *Beauveria bassiana*:

- 1.- Se preparó PDA (Papa Dextrosa Agar) mediante cálculos recomendados tanto para el agua destilada y para el PDA.
  - Cantidad para el agua destilada: 100mL a razón de 5 cajas Petri.
  - Cantidad para el agar: 39gr a razón de 1000mL de agua destilada.
- 2.- Se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave con los materiales utilizados en este caso fueron pinzas, porta bisturís, cajas Petri de vidrio y azas por un período de tiempo de 45 minutos.
- 3.- Seguidamente se debe desinfectar con cloro y después con alcohol la cámara de flujo laminar, una vez que el medio y los materiales se encuentren esterilizados, se los colocó en la cámara.

4.- Luego de que el medio de cultivo sea llevado a la cámara de flujo laminar se dejó enfriar el mismo a temperatura ambiente y se colocó el antibiótico, en este caso se ocupó “Gentamax 280” en su presentación de ampolla, el mismo que se mezcló con el medio de cultivo y se dispensó en cada caja Petri.

5.- De la caja Petri que contenían los cultivos desarrollados, se realizó un corte con un bisturí de la parte que contenga mayor porción del micelio blanco y con una pinza se retiró el pedazo cortado y se lo colocó en la caja Petri, en este caso también se realizaron frotis en algunas cajas Petri, luego se colocó una cinta Parafilm y se identificó la caja Petri, y finalmente se colocó en la cámara de incubación a una temperatura promedio de 24°C.

6.- Al transcurso de 7 días se observó la caja Petri cubierta con *B. bassiana*. La misma que será considerada como el primer subcultivo.

7.- Al obtenerse el primer subcultivo limpio y sin ninguna contaminación, se preparó nuevamente medio de cultivo suplementado con el antibiótico antes mencionado.

8.- Del subcultivo de *Beauveria. bassiana* se realizó unos cortes de 5 mm con el bisturí y cada corte se colocó en una caja Petri respectivamente, después se selló con la cinta Parafilm y se identificó por fechas después de haberse sembrado.

9.- Finalmente se envolvió en papel film y se colocó las cajas en la cámara de incubación y al transcurso de 7 días se observó que las nuevas cajas estaban cubiertas con *B. bassiana*.

### **10.12.3. Fase de conteo y elaboración de la solución madre.**

Previo a la aplicación en las unidades experimentales, se realizó una prueba para determinar la cantidad de suspensión de conidias que podría alcanzar toda el área de una mazorca. El resultado obtenido fue de 60 roseadas que equivale a 10ml por cada mazorca.

Por cada unidad experimental = 10 ml

Total, volumen a utilizar = 24 unidades experimentales x 10 ml = 240 ml

Volumen con diferentes *Beauveria bassiana*:

*Beauveria bassiana* costa = 120 ml

*Beauveria bassiana* sierra = 120 ml

Para la elaboración de esta fase se empleó la metodología utilizada por (Antía y Posada, 1992), quienes mencionan que, para la preparación de la solución madre se debe realizar con

un volumen de Agua Destilada Estéril a razón de 240mL y el hongo producido en las cajas Petri de plástico y de vidrio.

### 10.12.3.1. Solución madre

A continuación, se detalla la elaboración de los pasos a seguir para la solución madre:

- 1.- Se seleccionó 5 cajas Petri de las cepas de *Beauveria bassiana* nativa de la sierra y 7 cajas Petri de las cepas de *Beauveria bassiana* nativa de la costa, para ello se seleccionó las características del micelio como su coloración, esporulación y sin contaminación.
- 2.- En cada una de las cajas Petri se colocó agua destilada estéril seguidamente se realizó un raspado sobre el hongo con la ayuda de una aza metálica.
- 3.- El resultado del raspado del hongo de cada caja Petri se lo depositó en un vaso de precipitación de 500mL.
- 4.- Finalmente a estas soluciones se le colocó el reactivo Tween 80, para ello se realizó el siguiente cálculo:

$$C_1 \cdot v_1 = C_2 \cdot v_2$$

Donde:

$C_1$  = A la concentración de la solución inicial que tenemos.

$V_1$  = Al volumen que se debe utilizar para la dilución.

$C_2$  = A la concentración que deseamos alcanzar.

$V_2$  = Al volumen final de la dilución.

Para ello se calculó de la siguiente manera:

$$80\% \cdot v_1 = 0.05\% \cdot 240mL$$

$$v_1 = \frac{0,05\% - 240mL}{80\%}$$

$$v_1 = 0,15mL$$

A razón de 1mL es igual a 1000<sub>uL</sub> para ello se realizó una regla de tres:

$$\begin{array}{cc} 1 \text{ mL} & 1000 \text{ uL} \\ 0,15 \text{ mL} & x \end{array}$$

$$x = 150 \text{ uL}$$

Dando como resultado 150<sub>uL</sub> del reactivo Tween 80 que se debe colocar en las soluciones madres.

### 10.12.3.2. Conteo de esporas

Para el conteo de esporas de las cepas de *Beauveria bassiana* nativas se detallan los siguientes pasos:

- 1.- Una vez colocado el reactivo Tween 80 a razón de 150<sub>uL</sub> en las soluciones madres se procedió a mezclar hasta obtener una mezcla homogénea algo espumosa hasta que se disuelva todo el reactivo. Esto se realizó para dispersar las esporas del hongo y así se nos facilite el conteo.
- 2.- A las soluciones madres de *Beauveria bassiana* nativas se agitó durante 4 minutos en el agitador a 300 rpm (revoluciones por minuto) con el fin de volver a tener esa mezcla homogénea ya mencionada.
- 3.- Con la ayuda de una micropipeta o pipeta volumétrica se extrajo 60<sub>uL</sub>, luego se colocó en la cámara de Neubauer, después se tapó con un cubre objetos y finalmente se observó en el lente de 40x en el microscopio.
- 4.- Para el conteo de esporas se lo hizo en forma de zigzag por cada cuadrante. Únicamente se contó las esporas que se encontraban al interior de cada cuadrante y descartando las esporas que se encontraban fuera de las divisiones.

A continuación, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo de esporas} = \frac{\# \text{ total de esporas}}{\# \text{ de cuadrantes contabilizados}} \times \frac{10.000}{\# \text{ de subcuadrantes contabilizados}}$$

**Nota:** En el caso de haber diluciones multiplicar por las veces realizadas de las mismas.

### 10.12.3.3. Elaboración de las concentraciones

Una vez que la concentración de la solución madre se determinó se procede hacer las siguientes diluciones para las demás concentraciones.

1.- Con la ayuda de una gradilla en cuatro tubos de ensayo (1, 2, 3, 4) se colocó 9mL de agua destilada estéril.

2.- Después se realizó diluciones con la ayuda de una micropipeta se extrajo 1mL de la suspensión madre y se colocó en el tubo de ensayo A, luego de la dilución A se extrajo 1mL y se colocó en el tubo de ensayo B, posteriormente de la dilución B se extrajo 1mL y se colocó en el tubo de ensayo C y finalmente de la dilución C se extrajo 1mL y se colocó en el tubo de ensayo D, esta fue la última dilución. Las mismas que fueron sometidas a un agitador.

3.- Finalmente se realizó el conteo de esporas por cada dilución, dando así las siguientes concentraciones para cada *Beauveria* nativa:  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ .

A continuación, se detalla el número de cajas utilizadas de las dos *Beauverias* nativas para alcanzar las concentraciones con sus respectivas diluciones:

- ***Beauveria bassiana* (Costa)**

Para alcanzar a la concentración uno (C1) se utilizó 5 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 30 esporas dando como resultado en notación científica  $4 \times 10^5$ .

Luego para alcanzar a la concentración dos (C2) se utilizó 2 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 18 esporas dando como resultado en notación científica  $3 \times 10^7$ .

Finalmente, para alcanzar a la concentración tres (C3) se utilizó 6 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 11 esporas dando como resultado en notación científica  $2 \times 10^9$ .

- ***Beauveria Bassiana* (Sierra)**

Para alcanzar a la concentración uno (C1) se utilizó 7 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 8 esporas dando como resultado en notación científica  $1 \times 10^5$ .

Luego para alcanzar a la concentración dos (C2) se utilizó 6 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 9 esporas dando como resultado en notación científica  $1 \times 10^7$ .

Finalmente, para alcanzar a la concentración tres (C3) se utilizó 7 cajas Petri, con su respectiva dilución se contó 9 esporas dando como resultado en notación científica  $1 \times 10^9$ .

#### **10.12.4. Fase de aplicación de *Beauveria bassiana* en la plaga a evaluarse.**

Seguidamente se realizó la colecta y mantenimiento de la plaga en este caso fueron larvas de la mosca de los estigmas del maíz (*Euxesta stigmatias.*), bajo condiciones controladas de laboratorio,

##### **10.12.4.1. Colecta y Preservación de las larvas**

A continuación, se detalla el procedimiento y materiales utilizados para la recolección y mantenimiento de las larvas:

##### **Materiales:**

1. Mazorcas de maíz infestadas con larvas de la mosca de los estigmas.
2. Vasos cervecedores o tarrinas plásticas.
3. Medias nylon.
4. Cordón elástico.
5. Caja acrílica 50cm x 30 cm
6. Azúcar.
7. Agua miel.
8. Vitaminas A y E.
9. Rociador.

##### **Procedimiento:**

1.- Las mazorcas infestadas con esta plaga se obtuvieron en un cultivo ubicado en el Barrio Ecofróz perteneciente a la parroquia de Machachi, cantón Mejía, provincia de Pichincha. E inmediatamente fueron trasladadas a laboratorio.

2.- En un recipiente de plástico vasos y tarrinas, se colocó las mazorcas infestadas y también se añadió mazorcas sanas para su alimentación. A las larvas se las alimentaba tres veces a la semana.

3.- Finalmente se tapó con medias nylon la parte exterior de los vasos y tarrinas sujetadas con cordones elásticos.

Para su mantenimiento y alimentación se empleó la metodología utilizada por (García y Camacho, 2010), mencionando que, para las larvas y adultos; éstos últimos se alimentaron con agua azucarada diluida, miel de abeja, vitaminas y agua. Mientras tanto, las larvas se

mantuvieron dentro de una cámara de cría hecha con material acrílico. Para ello a continuación se detalla los pasos de la preparación de la alimentación de las larvas que fue editada en el laboratorio de Agronomía:

- Miel de abeja 25%.
- Azúcar 25%.
- Agua 50%.
- Vitamina A y E 15ml por cada una, a razón de 300ml.

4.- Seguidamente se colocó en un rociador y se procedió a la alimentación de las larvas.

5.- Después se tapó los recipientes con medias nylon y se sujetó con cordones elásticos.

6.- Finalmente cada vaso y tarrina plástica fueron colocadas dentro de una caja acrílica para evitar que se salgan.

7.- Luego de 5 días se observó el incremento de número de larvas de *Euxesta stigmatias.*, obteniendo una población de larvas listas para ser utilizadas en el bioensayo.

#### **10.12.4.2. Implementación del bioensayo**

A continuación, se detalla los materiales utilizados:

##### **Materiales:**

1. Mazorcas de maíz (24).
2. Tarrinas plásticas blancas (24).
3. Algodón húmedo.
4. Medias nylon.
5. Cinta doble faz.
6. Cordón elástico.

##### **Procedimiento:**

- 1.- En cada tarrina plástica se colocó en la parte inferior un algodón húmedo.
- 2.- Seguidamente se introdujo en cada tarrina las mazorcas de maíz.
- 3.- Luego se colocó las 15 larvas por cada unidad experimental.

4.- En la parte superior de las tarrinas plásticas se tapó con medias nylon y se sujetó con cordones de elástico, a su vez para que la media nylon no se resbale se puso cinta doble faz en las esquinas de las tarrinas.

#### **10.12.4.3. Aplicación de *Beauveria bassiana* nativas.**

La metodología de la aplicación fue de la siguiente manera:

- 1.- Se tomó 10ml de cada concentración y se depositó en un rociador.
- 2.- Luego se procedió a fumigar cada unidad experimental de acuerdo al diseño establecido de la siguiente manera: Se destapó la mazorca, luego se procedió a fumigar toda la mazorca y se dejó reposar por 5 minutos.
- 3.- Y finalmente se volvió a tapar la parte exterior de las tarrinas.

Este proceso se utilizó para las fumigaciones de la *Beauveria* nativa (costa y sierra) con una aplicación de forma preventiva y curativa.

### **10.13. Datos a Evaluar.**

#### **10.13.1. Porcentajes de larvas muertas:**

Se realizó el conteo de larvas muertas, después de la aplicación de *Beauveria bassiana*, durante siete días, de cada unidad experimental se retiró las larvas, se colocó en una caja Petri y mediante el estereoscopio se verificó la cantidad de larvas muertas.

(Delgado, 2014), menciona que, para calcular el porcentaje de mortalidad de larvas se empleó la fórmula de Abbot corregida:

$$\%Mc = (X - Y/X) * 100$$

Donde:

**%Mc** = Porcentaje de mortalidad corregida.

**X** = Porcentaje de larvas vivas en el control.

**Y** = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento.

**Nota:** Si el porcentaje de mortalidad de larvas en el control es mayor al 20 %, se debe descartar el bioensayo y deberá ser repetido nuevamente.

#### **10.13.2. Porcentaje de granos dañados.**

Para esta variable se realizó el conteo de número de granos infestados o dañados, es decir, el conteo de cada grano que este perforado por las larvas de la mosca de los estigmas *Euxesta stigmatias.*, a su vez se procedió hacer un promedio de granos totales de las mazorcas.

Para ello el porcentaje de granos dañados se calculó con la siguiente fórmula: (INEN, 1987)

$$\% \text{ de Granos dañados} = \frac{\# \text{ de Granos dañados}}{\# \text{ total de Granos sanos}} (100)$$

#### **10.14. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos se registraron y ordenaron en una hoja de cálculo de Excel, posteriormente se utilizó el programa InfoStat para subir los datos obtenidos acorde al diseño experimental empleado en la investigación para la obtención del ADEVA.

#### **10.15. Prueba de Patogenicidad.**

Para esta fase se utilizó la metodología empleada por (Vélez, Posada, y Marín, 1997), quienes mencionan que, esta es una prueba muy importante ya que determina si el patógeno verdaderamente ataca a la plaga por lo cual es recomendado.

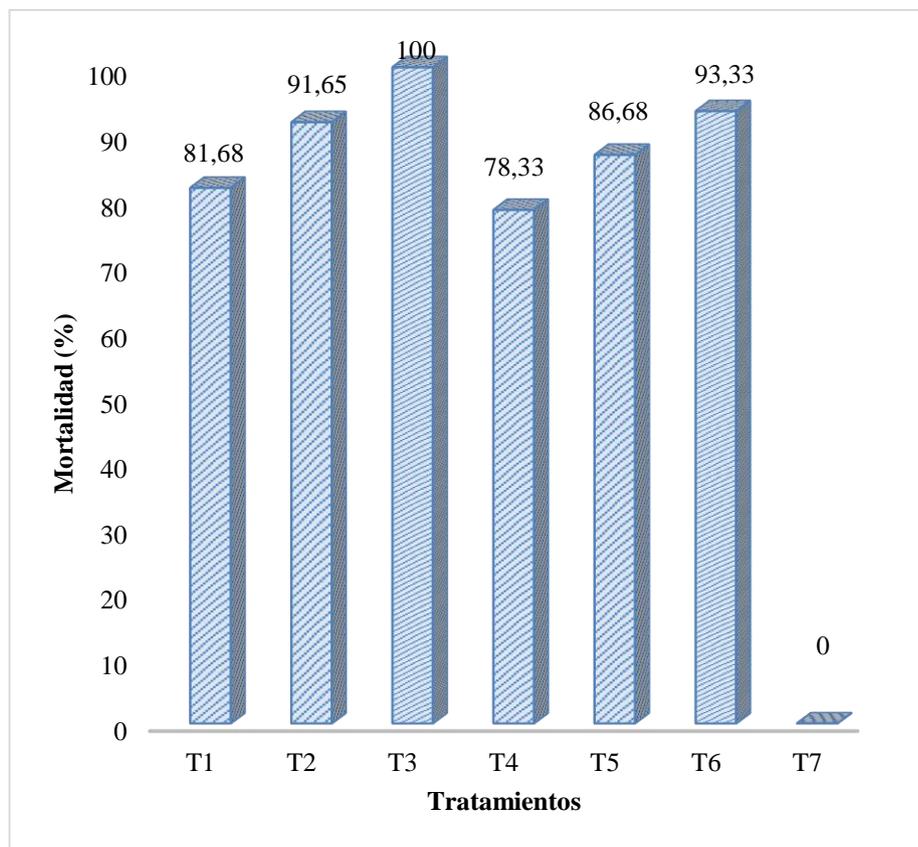
## CAPÍTULO IV

### 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 11.1. Análisis de mortalidad de larvas de *Euxesta stigmatias*

En las siguientes tablas se presentan los datos de mortalidad de larvas de *Euxesta stigmatias*, controladas con suspensiones de *Beauveria bassiana* en tres diferentes concentraciones aplicadas a mazorcas de maíz bajo condiciones controladas.

**Gráfico 6.** Porcentaje de mortalidad total de los tratamientos.



En el gráfico 6, se observa la mortalidad de los tratamientos, siendo el T3 (*Beauveria bassiana* nativa sierra con concentración  $10^9$ ) el mayor porcentaje con un 100% mientras que el T7 (Testigo) obtuvo un 0% de mortalidad.

**Tabla 10.** ADEVA para la variable porcentaje de mortalidad de *Euxesta stigmatias* en estadio larval.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Total	28561	27				
Repeticiones	156,67	3	52,22	4,48	0,0162	n. s
Tratamientos	28195	6	4699	402,75	<0,0001	**
Factor A ( <i>Beauveria</i> )	150	1	150	7,36	0,0142	*
Factor B (Concentraciones)	1114,24	2	557,12	27,35	<0,0001	**
Factor A*Factor B	11,06	2	5,53	0,27	0,7654	n. s
Factorial vs Adicional	26919,21	1	26919,2	2307,2	<0,0001	**
Error	210,01	18	11,67			
CV %					4,50	

En la tabla 10, se observa que, si existe diferencias altamente significativas para los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7), para el Factor B (Concentraciones), para el factorial vs adicional y el Factor A (*Beauveria bassiana*). En el cual se obtuvo un coeficiente de variación de 4,50% lo cual indica que existió un correcto manejo de las unidades experimentales durante la fase de estudio.

**Tabla 11.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos en la mortalidad de larvas de *Euxesta stigmatias*.

Tratamientos	Medias	Rangos	
T3 <i>Beauveria b. sierra</i>	C3 100	A	
T6 <i>Beauveria b. costa</i>	C3 93,33	A	B
T2 <i>Beauveria b. sierra</i>	C2 91,65	B	
T5 <i>Beauveria b. costa</i>	C2 86,68	B	C
T1 <i>Beauveria b. sierra</i>	C1 81,68	C D	
T4 <i>Beauveria b. costa</i>	C1 78,33	D	
T7 Adicional	0	E	

En la tabla 11, se puede observar que, el T3 (*Beauveria nativa sierra* con la concentración  $10^9$

esporas/ml) se encuentra en el rango A con una media de 100% siendo el mayor, mientras que el T4 (*Beauveria nativa* costa con la concentración  $10^5$  esporas/ml) se ubica en el rango D con una media de 78,33% siendo el menor.

Los resultados de mortalidad de *Euxesta stigmatias* obtenidos son similares con lo observado por (Venegas, 2017), quien en su experimento con *Beauveria bassiana* y larvas de *Euxesta stigmatias* obtuvo una mortalidad de 97 a 100% de larvas. Además, se encontró que *Beauveria bassiana* fue capaz de infectar a adultos de la mosca, lo que demuestra a nivel de laboratorio la toxicidad de esta cepa nativa en concentraciones de  $1 \times 10^9$  esporas/ml, misma concentración que se empleó en la investigación en cual se obtuvo un 100% de mortalidad. También los autores (Georgette, Rodríguez, y Cueva, 2014), han obtenido datos diferentes con respecto a la acción biocida sobre larvas de *Ae. aegypti*, tratados a la concentración de  $1,3 \times 10^7$  esporas/ml de *Beauveria bassiana* con un porcentaje de mortalidad mayor a 80%, lo cual indica que podría acercarse a la concentración  $10^7$  esporas/ml, con un porcentaje de 91,65% obtenida en la investigación. Los mismos autores registraron la concentración más baja ( $2,5 \times 10^5$  esporas/ml), con una mortalidad de 85%, valor similar a la mortalidad obtenida a la concentración más baja ( $10^5$  esporas/ml) con un 81,68% de mortalidad. Además (García, 2011), concluye que a partir de la concentración  $10^9$  esporas/ml de *Beauveria bassiana* son los más virulentos para *Euxesta stigmatias*, dato que concuerda con la mortalidad obtenida de la concentración ( $10^9$  esporas/ml) con un 100% dentro de esta investigación. A continuación, se aplicó la prueba de Tukey al 5 %, para la comparación de rangos para cada uno de los factores, su interacción y tratamientos que tienen significancia estadística en el porcentaje de mortalidad de larvas de *Euxesta stigmatias*.

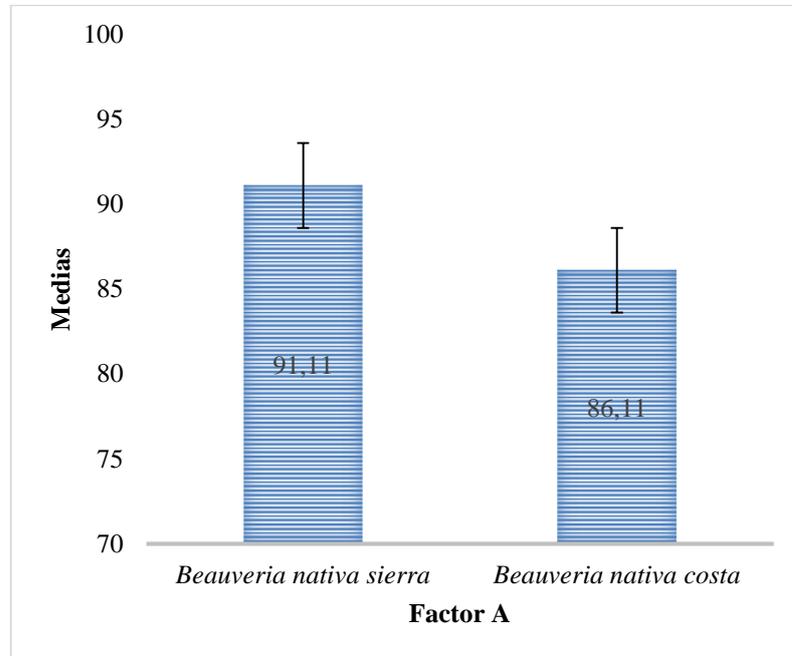
**Tabla 12.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.

Factor A ( <i>Beauveria</i> )		Medias	Rangos
<i>Beauveria b.</i> nativa sierra	B1	91,11	A
<i>Beauveria b.</i> nativa costa	B2	86,11	B

En la tabla 12, se observa la prueba de Tukey al 5% para el Factor A, donde los resultados muestran dos rangos de significancia estadística donde, la *Beauveria nativa* sierra, se

encuentra en el rango A con una media de 91,11% siendo la mayor, mientras que la *Beauveria nativa* costa, se ubica en el rango B con una media de 86,11% siendo la menor.

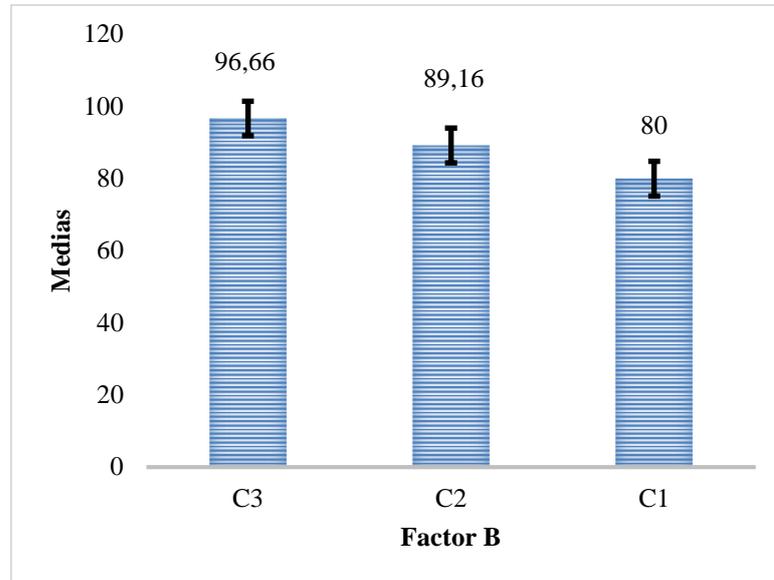
**Gráfico 7.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.



**Tabla 13.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor B.

Factor B (Concentraciones)		Medias	Rangos
Concentración $10^9$ esporas/ml	C3	96,66	A
Concentración $10^7$ esporas/ml	C2	89,16	B
Concentración $10^5$ esporas/ml	C1	80	C

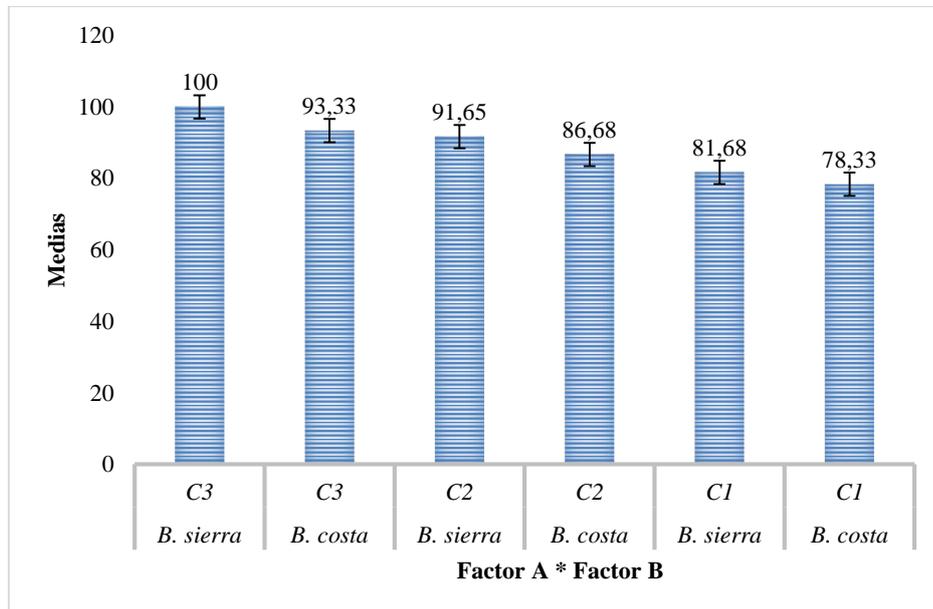
En la tabla 13, se puede observar tres rangos de significancia estadística, donde la C3 (Concentración  $10^9$  esporas/ml) se encuentra en el rango A con una media de 96,66% siendo el mayor, mientras que la C2 (Concentración  $10^7$  esporas/ml) se ubica en el rango B con una media de 89,16% y la C1 (Concentración  $10^5$  esporas/ml) se ubica dentro del rango C con una media de 80% siendo la menor.

**Gráfico 8.** Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para el Factor B.**Tabla 14.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y Factor B.

Factor A	Factor B	Medias	Rangos
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>9</sup> esporas/ml	100	A
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>9</sup> esporas/ml	93,33	A B
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>7</sup> esporas/ml	91,65	A B C
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>7</sup> esporas/ml	86,68	B C D
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>5</sup> esporas/ml	81,68	C D
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>5</sup> esporas/ml	78,33	D

En la tabla 14, se puede observar cuatro rangos de significancia estadística, la *Beauveria nativa* sierra con 10<sup>9</sup> esporas/ml, se encuentra en el rango A con una media de 100% siendo el mayor rango y la *Beauveria nativa* costa con 10<sup>5</sup> esporas/ml, en el rango D con una media de 78,33% siendo el menor.

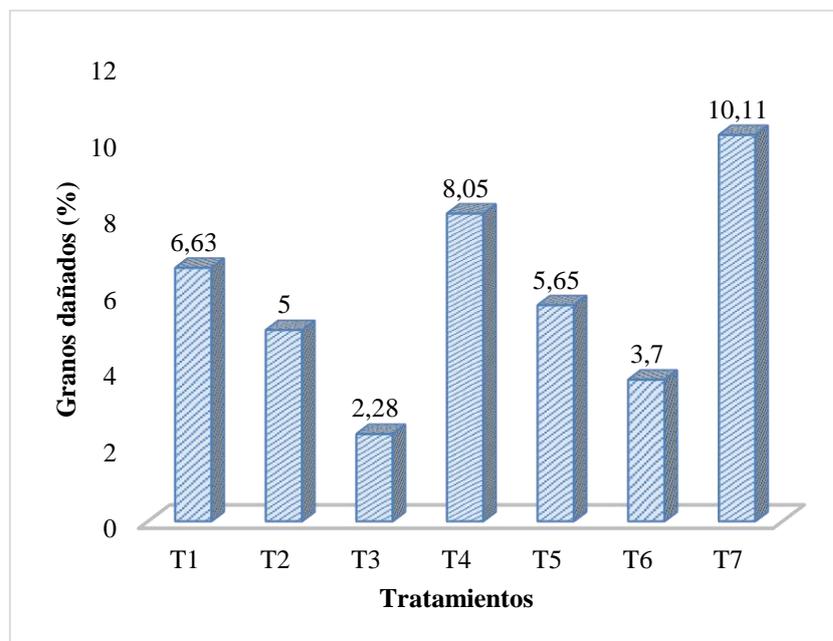
**Gráfico 9.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y el Factor B.



### 11.2. Análisis de Porcentaje de Granos Dañados.

En las siguientes tablas se presentan los datos del porcentaje de granos dañados del choclo.

**Gráfico 10.** Porcentaje de granos dañados total de los tratamientos.



En el gráfico 10, se observa el porcentaje de granos dañados, siendo el T3 (*Beauveria bassiana* con concentración  $10^9$  esporas/ml) el menor con un porcentaje de 2,28%, mientras que el T11 (Adicional) obtuvo un porcentaje de 10,11% siendo el mayor porcentaje.

**Tabla 15.** ADEVA para la variable de porcentaje de granos dañados.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Total	187,74	27				
Repeticiones	0,13	3	0,04	0,04	0,9896	n. s
Tratamientos	166,73	6	27,79	23,96	<0,0001	**
FACTOR A ( <i>Beauveria</i> )	8,1	1	8,1	11,93	0,0028	*
FACTOR B (Concentraciones)	75,79	2	37,89	55,86	<0,0001	**
FACTOR A * FACTOR B	0,78	2	0,39	0,57	0,5737	n. s
Factorial vs Adicional	82,07	1	82,07	70,76	<0,0001	**
Error	20,88	18	1,16			
CV %					18,20	

En la tabla 15, se observa que, si existe diferencias altamente significativas para los tratamientos, para el Factor B y el testigo vs tratamientos. En el cual se obtuvo un coeficiente de variación de 18,20% lo que se interpreta que existió un adecuado manejo de las unidades experimentales durante la fase de estudio.

**Tabla 16.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos en los granos dañados.

Tratamiento		Medias	Rangos				
T3	<i>Beauveria b.</i> sierra	C3	2,28	A			
T6	<i>Beauveria b.</i> costa	C3	3,7	A	B		
T2	<i>Beauveria b.</i> sierra	C2	5	B		C	
T5	<i>Beauveria b.</i> costa	C2	5,65	B		C	D
T1	<i>Beauveria b.</i> sierra	C1	6,63	C			D
T4	<i>Beauveria b.</i> costa	C1	8,05	D			E
T7	Adicional		10,11	E			

En la tabla 16, se puede observar que el T3 (*Beauveria nativa* sierra con la concentración de

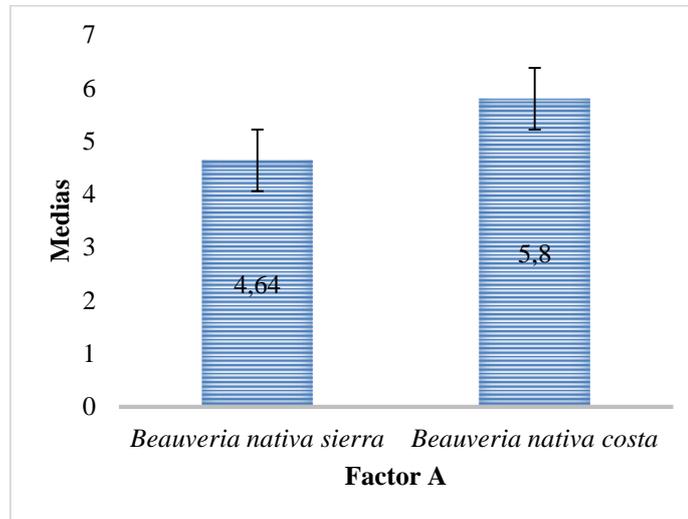
10<sup>9</sup> esporas/ml) se encuentra en el rango A con una media de 2,28% siendo el menor, mientras que el T4 (*Beauveria nativa* costa con la concentración 10<sup>5</sup> esporas/ml) se ubica en el rango E con una media de 8,05% siendo la mayor.

Los resultados obtenidos en la variable porcentaje de granos dañados son diferentes a los resultados obtenidos de (Arenillo, 2017), quien en su ensayo con *Beauveria bassiana* y *Euxesta stigmatias* obtuvo un promedio de 0,13% siendo el menor, y al comparar con los datos obtenidos de la presente investigación se puede observar que existe un 2,15% de diferencia ya que el menor porcentaje más bajo de granos dañados dentro de esta investigación fue de 2,28% en el T3 (*Beauveria nativa* sierra con la concentración de 10<sup>9</sup>). Además, (Venegas, 2017), obtuvo un porcentaje alto de 12% en el adicional en comparación con los otros tratamientos, situación similar que se evidencio en la investigación comparado con el adicional (T11) que obtuvo un 10,11%.

**Tabla 17.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.

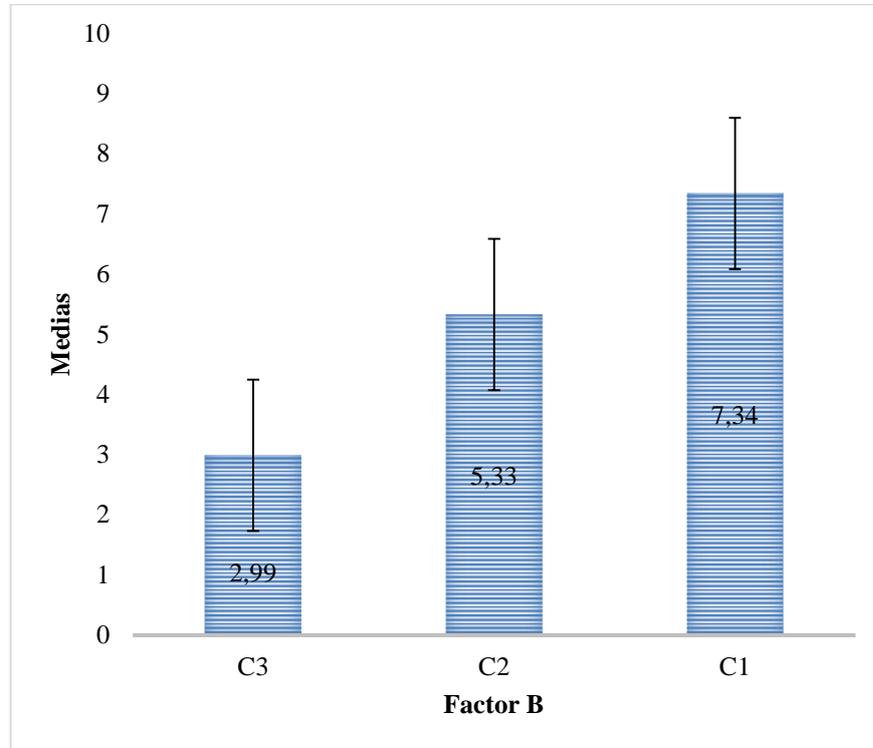
Factor A ( <i>Beauveria</i> )		Medias	Rangos
<i>Beauveria b. nativa</i> sierra	B1	4,64	A
<i>Beauveria b. nativa</i> costa	B2	5,8	B

En la tabla 17, se puede observar que tenemos dos rangos de significancia estadística, la *Beauveria nativa* sierra se encuentra en el rango A con una media de 4,64% siendo el menor, mientras que la *Beauveria nativa* costa se ubica en el rango B con una media de 5,8% siendo el mayor.

**Gráfico 11.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor A.**Tabla 18.** Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para el Factor B.

Factor B (Concentraciones)		Medias	Rangos
Concentración $10^9$ esporas/ml	C3	2,99	A
Concentración $10^7$ esporas/ml	C2	5,33	B
Concentración $10^5$ esporas/ml	C1	7,34	C

En la tabla 18, se puede observar tres rangos de significancia estadística, donde la C3 (Concentración  $10^9$  esporas/ml) se encuentra en el rango A con una media de 2,99% siendo la menor, mientras que la C2 (Concentración  $10^7$  esporas/ml) se ubica en el rango B con una media de 5,33% y la C1 (Concentración  $10^5$  esporas/ml) se ubica dentro del rango C con una media de 7,34% siendo la mayor.

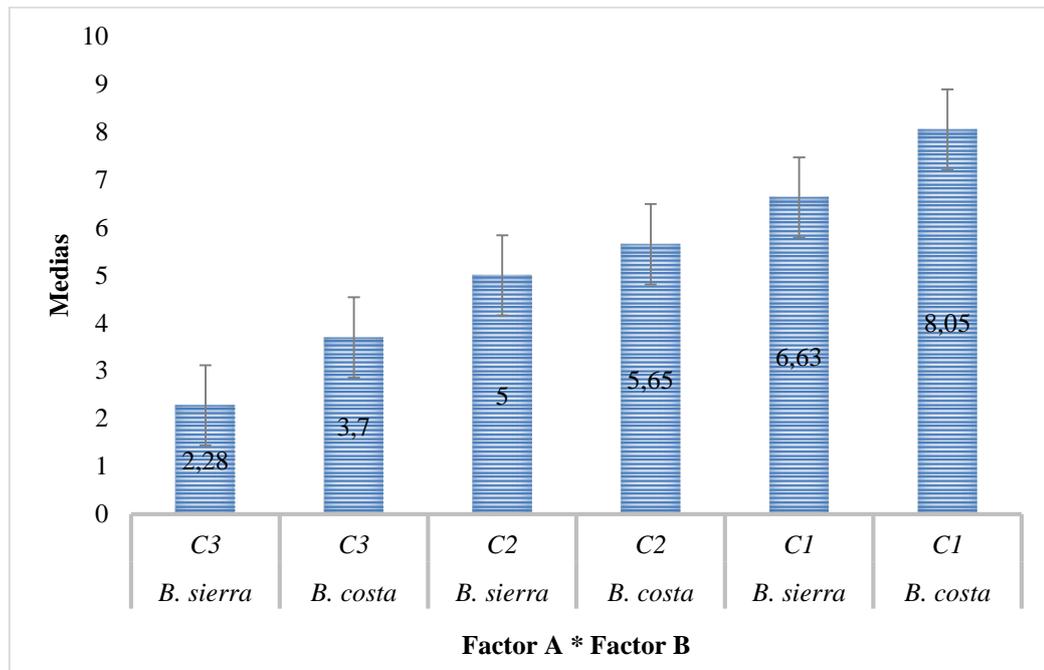
**Gráfico 12.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para el Factor B.**Tabla 19.** Prueba de Tukey, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y Factor B.

Factor A	Factor B	Medias	Rangos
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>9</sup> esporas/ml	2,28	A
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>9</sup> esporas/ml	3,7	A B
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>7</sup> esporas/ml	5	B C
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>7</sup> esporas/ml	5,65	C
<i>Beauveria b. sierra</i>	10 <sup>5</sup> esporas/ml	6,63	C D
<i>Beauveria b. costa</i>	10 <sup>5</sup> esporas/ml	8,05	D

En la tabla 19, se puede observar cuatro rangos de significancia estadística, la *Beauveria nativa* sierra con 10<sup>9</sup> esporas/ml, se encuentra en el rango A con una media de 2,28% siendo

el menor y la *Beauveria nativa* costa con  $10^5$  esporas/ml, en el rango D con una media de 8,05% siendo la mayor.

**Gráfico 13.** Prueba de Tukey 5%, para la comparación de rangos para la interacción entre el Factor A y el Factor B.



## 12. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES Y ECONÓMICOS)

Los impactos generados en los ámbitos técnicos, sociales, ambientales y económicos son los siguientes:

### 12.1. Impactos Técnicos.

Con el uso de microorganismos biológicos que son el beneficio para la agricultura es considerada como una ciencia, de esta manera al utilizar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de larvas de la mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*), se genera una alternativa de control frente a la utilización de insecticidas químicos; con esta investigación y con los resultados esperados se está en la capacidad de poner en uso esta alternativa con el propósito de beneficiar a los productores de maíz.

### **12.2. Impactos Sociales.**

Los resultados obtenidos estarán a disposición de toda la población que lo necesite, además la metodología satisface gran parte de la investigación detallada de manera explicativa desde la reactivación de *Beauveria bassiana* a partir del método de AGAR INSECTO y multiplicación, todo esto con el propósito de que los productores y estudiantes se interesen por el uso de este hongo entomopatógeno y den continuación a futuras investigaciones.

### **12.3. Impactos Ambientales.**

Esta investigación aporta en el cuidado del medio ambiente ya que al proporcionar una alternativa de control biológico mediante el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, se erradica los efectos devastadores de productos tóxicos hacia el medio ambiente.

### **12.4. Impactos Económicos.**

El uso masivo de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* tiene un gran potencial de disminuir la cantidad de insecticidas químicos aplicados en la agricultura, salvaguardando la sanidad de las mazorcas del maíz, esto a su vez beneficiará al productor reduciendo pérdidas por infestación de *Euxesta stigmatias*, en las mazorcas.

## CAPÍTULO V

### 13. CONCLUSIONES

- Se determinó que la mejor cepa fue *Beauveria bassiana* sierra para el control de la mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*), en estadio larval.
- Se identificó que la mejor concentración fue la más alta con  $10^9$  esporas/ml, siendo la más eficiente para el control de larvas de *Euxesta stigmatias*.
- El tratamiento tres fue el mejor con la aplicación de *Beauveria bassiana* nativa sierra con la concentración  $10^9$  esporas/ml, obteniendo un 100% de mortalidad de las larvas con un 2,28% de granos dañados.

### 14. RECOMENDACIONES

- Realizar un ensayo bajo condiciones controladas con la concentración  $10^9$  esporas/ml de *Beauveria bassiana* nativa sierra, para determinar una adecuada concentración para el control de la mosca de los estigmas (*Euxesta stigmatias*) en estadio larval.
- Realizar ensayos con la aplicación de la concentración de  $10^9$  esporas/ml de *Beauveria bassiana* en otra especie del orden Díptera, para comprobar si se obtiene porcentajes de mortalidad similares obtenidos en esta investigación.

## 15. BIBLIOGRAFÍAS

- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maiz en Cuba. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362009000200016#:~:text=En%20Cuba%2C%20los%20trabajos%20iniciales,los%20tipos%20encontrados%20en%20M%C3%A9xico.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000200016#:~:text=En%20Cuba%2C%20los%20trabajos%20iniciales,los%20tipos%20encontrados%20en%20M%C3%A9xico.)
- Antía, O., & Posada, F. (1992). Produccion en finc a del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del cafe. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/233957052>
- Arenillo, R. (2017). Evaluación de daños producidos por *Euxesta spp*, en la mazorca de maíz suave en dos localidades de Pichincha - Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13585/1/T-IASA%20I-005359.pdf>
- Arenillo, R. (2017). Evaluación de daños producidos por *Euxesta spp*, en maíz suave, en dos localidades de Pichincha - Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13585/1/T-IASA%20I-005359.pdf>
- Arenillo, R. (2017). Evaluación de daños producidos por *Euxesta spp*. (Diptera:ulidiidae) en la mazorca de maíz suave, de Pichincha - Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/13585>
- Brito, e. (2018). La Evaluación del control biológico de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7355010>
- Camacho, J., & Mundo, M. (2012). Enemigos naturales de las moscas de los estigmas del maíz:*Euxesta stigmatias* (Loew), *Chaetopsis massyla* (Walker) y *Eumecosommyia nubila* (Wiedemann) en Guasave Sinaloa, México. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46125177008.pdf>
- Castillo, C., & Choquetarqui, D. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. Obtenido de <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/academia/v11n23/art08.pdf>
- Caviedes, M. (2018). Producción de semilla de maíz duro en el Ecuador: retos y oportunidades. doi:<https://doi.org/10.18272/aci.v11i1.1100>
- CERTIS. (2022). *Beauveria bassiana*. Obtenido de <https://www.certiseurope.es/noticias/detalle/news/beauveria-bassiana-todo-lo-que-necesitas-saber>

- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (YSAÚ). Obtenido de <file:///C:/Users/Andy/Downloads/Chiriboga%20et%20al.,%202015.pdf>
- Delgado, N. (2014). Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis probit. Obtenido de [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia3/Metodos\\_para\\_realizar\\_Analisis\\_Probit\\_-\\_GU%C3%8DA.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Metodos_para_realizar_Analisis_Probit_-_GU%C3%8DA.pdf)
- Fassio, A. C. (2011). Maíz: Aspectos sobre fenología.
- García, C. (2011). Control biológico de la mosca de los estigmas del maíz. Obtenido de [file:///C:/Users/Andy/Downloads/Control%20biol%C3%B3gico%20de%20la%20mosca%20de%20los%20estigmas%20del%20ma%C3%ADz%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Andy/Downloads/Control%20biol%C3%B3gico%20de%20la%20mosca%20de%20los%20estigmas%20del%20ma%C3%ADz%20(2).pdf)
- García, C., & Camacho, J. (2010). Mosca de los estigmas del maíz: comportamiento y control biológico. Obtenido de <https://silo.tips/download/comportamiento-y-control-biologico-de-la-mosca-del-estigma-en-maiz>
- Georgette, J., Rodríguez, R., & Cueva, S. (2014). Efecto Biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* ccb-le302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes Aegypti*. Obtenido de [file:///C:/Users/Andy/Downloads/Dialnet-EfectoBiocidaDeDiferentesConcentracionesDeMetarhiz-6181540%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Andy/Downloads/Dialnet-EfectoBiocidaDeDiferentesConcentracionesDeMetarhiz-6181540%20(1).pdf)
- IICA. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (YSAÚ). Obtenido de <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf>
- INEN. (1987). Granos y cereales, Método de ensayo, Arroz, Soya, Maíz. Obtenido de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1236.pdf>
- Injante, P., & Joyo, G. (2010). Jornada de capacitación unalm – agrobanco. Obtenido de [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:BZI6YGTgecYJ:www.agrobanco.com.pe/pdfs/capacitacionesproductores/mad/manejo\\_integrado\\_de\\_maiz\\_amarillo\\_duro.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:BZI6YGTgecYJ:www.agrobanco.com.pe/pdfs/capacitacionesproductores/mad/manejo_integrado_de_maiz_amarillo_duro.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec)
- INTAGRI. (2020). *Beauveria bassiana* en el Control Biológico de Patógenos. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>

- MAIZAR. (2011). El maíz, primero en el mundo. Obtenido de <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=392>
- Martínez, L. (2010). Desarrollo de un protocolo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demotispa neivai* Bondar. Bogotá. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/70447>
- Merino, G., & Víctor Vázquez. (2001). Periodo de la emisión de estigmas de cuatro variedades de maíz y susceptibilidad de las mismas al ataque de *Helicoverpa sp.* y *Euxesta eluta* Loewe. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=2IMzAQAAMAAJ&pg=PA29&lpg=#v=onepage&q&f=false>
- Moino, A., & Sousa, R. s. (2017). Hongos y nematodos entomopatógenos. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/667/cap10.pdf>
- Noboa, G., & Quedal, A. (2015). Taxonomía del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>
- Ortega, A. (2014). Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. Obtenido de <https://www.gruposacsa.com.mx/mosca-de-los-estigmas-del-maiz/>
- Ortigoza, J. (2019). Guía técnica del cultivo de maíz. Obtenido de [https://www.jica.go.jp/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt\\_04.pdf](https://www.jica.go.jp/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt_04.pdf)
- Páliz, V. (2018). Plagas del maíz. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1616/1/Plagas%20de%20maiz%20%28Paliz%29%20Comunicaic%C3%B3n%20t%C3%A9cnica%20sin%20n%C3%BAmero.pdf>
- PANORAMA. (2015). Mosquita pinta - *Euxesta stigmatias*. Obtenido de <https://panorama-agro.com/?p=543>
- PANORAMA. (2015). Mosquita pinta - *Euxesta stigmatias*.
- Peñaherrera-D, M.-M. Y.-C. (2020). Guía para facilitar el aprendizaje sobre manejo integrado de maíz de altura (*Zea mays L.*). Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5581>
- Vélez, P., Posada, F., & Marín, P. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Federación Nacional de Cafeteros*

*Colombia.* Obtenido de <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:PtCEEq9aD18J:https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/guia1.pdf+&cd=14&hl=es&ct=clnk&gl=ec>

Venegas, J. (2017). Comportamiento y control biológico de la mosca de los estigmas en maíz. Obtenido de <https://silo.tips/download/comportamiento-y-control-biologico-de-la-mosca-del-estigma-en-maiz>

## 16. ANEXOS

### Anexo 1. Hoja de vida de la docente tutora



## Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** 6 de julio de 1979, Quito - Ecuador  
**LUGAR DE RESIDENCIA:** Av. Río Coca y Av. Seis de Diciembre, Condominios San Isidro, Quito - Ecuador  
**TELÉFONO:** 0984730356 - 062651205  
**E-MAIL:** diana\_toapanta@hotmail.com

### FORMACIÓN ACADÉMICA

**TÍTULO OBTENIDO:** Magíster en Ciencias Agronómicas mención Producción y Protección Vegetal, Universidad de Concepción, junio 2015, Chillán - Chile.

**TÍTULO OBTENIDO:** Especialización en Agrobiotecnología, Universidad Central del Ecuador, diciembre 2012, Quito - Ecuador.

**TÍTULO OBTENIDO:** Ingeniera Agropecuaria, Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, julio 19, 2007, Ibarra - Ecuador.

### PERFIL PROFESIONAL

Profesional en el área de la protección vegetal y control biológico con participación en proyectos de investigación para la conservación de especies vegetales y forestales, responsable de liderar actividades de monitoreo e investigación de campo.

### LINEAS DE INVESTIGACIÓN:

- Identificación y manejo de enfermedades.
- Diagnóstico y manejo de plagas.
- Control biológico de plagas y enfermedades en frutales.
- Identificación, conservación, manejo y cultivo de microorganismos con potencial biocontrolador.

## EXPERIENCIA PROFESIONAL

### Universidad Yachay Tech

Encargada del área de vinculación con la sociedad a cargo de la planificación, ejecución y difusión de actividades referentes a la participación efectiva de la institución en la sociedad, de noviembre 2019 a diciembre 2020.

### UC Davis Chile Life Sciences Innovation Center

Asistente de investigación para proyectos de I + D, a cargo de la planificación y desarrollo de actividades de laboratorio, actividades de campo, reuniones de coordinación con grupos de investigación, de marzo 2017 a diciembre 2018.

### Fundación Charles Darwin

Asistente de Investigación para la restauración ecológica de especies vegetales endémicas de Galápagos, a cargo de liderar actividades de monitoreo en campo, difusión y recaudación de fondos para el proyecto Galápagos Verde 2050, de julio a septiembre 2015.

### Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad y el Agro

Laboratorista a cargo del análisis e identificación de microorganismos fitopatógenos, (virus, hongos, bacterias) de material vegetal, agua y suelo, de julio a diciembre 2011.

### Ministerio de Ambiente y Agua

Proyecto "Revisión de las concesiones de agua de riego Demarcación Hidrográfica Cuenca del Río Mira", de julio a septiembre del 2010.

## EXPERIENCIA DOCENTE

### Universidad Central del Ecuador

Docente de Nivelación de las carreras de Medicina Veterinaria y Agronomía, de abril a julio 2019.

## ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

### Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Chile

Banco de la Colección de Recursos Microbianos Genéticos Microbianos de Chile, actividades de tesis de posgrado y conservación de accesiones, de marzo 2013 a junio 2015.

### Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Ecuador

Departamento Nacional de Biotecnología, actividades de tesis de posgrado en el área de biología molecular e identificación de patógenos de plantas, de abril 2009 a abril de 2010.

## PUBLICACIONES

Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador, Toapanta-Gallegos DE, Morillo-Velasteguí LE, Viera-Arroyo WF. 2017. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 18(2):285-294. doi: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num2\\_art:628](https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628)

Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against Trunk Pathogens, Silva-Valderrama I, Toapanta D, Miccono MA, Lolas M, Díaz GA, Cantu D and Castro A (2021 Front. Microbiol. 11:614620. doi: 10.3389/fmicb.2020.614620

## CURSOS REALIZADOS

### CEBIO ECUADOR

Bioingeniería, escalado de bioprocesos con enfoque en parámetros para manejo operacional de biorreactores, modalidad virtual, de 27 febrero a 13 de marzo del 2021.

### INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Primer Simposio Internacional de Manejo Integrado de Plagas en Solanáceas, 7 y 8 de octubre de 2015, Quito - Ecuador

### UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Plant viruses and virus diseases, del 10 al 18 de marzo del 2014, Chillán - Chile

### UNIVERSIDAD DE TALCA

XXIII Congreso de Fitopatología 2014, del 3 al 5 de diciembre del 2014, Talca - Chile.

## REFERENCIAS PERSONALES

### Álvaro Castro Ph.D.

Research Coordinator UC Davis Chile Life Sciences Innovation Center  
Correo: [alvcastro@ucdavischile.edu](mailto:alvcastro@ucdavischile.edu)  
Dirección: Andrés Bello 2299, Of. 1102, Providencia, Santiago de Chile

### Lenin Jácome Ph.D.

Coordinador de Servicios Escolares Universidad Yachay Tech  
Correo: [lsjacome@yachaytech.edu.ec](mailto:lsjacome@yachaytech.edu.ec)  
Teléfono: 0987310866

### Ing. Ana Garrido Msc.

Directora de Diagnóstico Vegetal en Agrocalidad  
Correo: [anagarridoharo@hotmail.com](mailto:anagarridoharo@hotmail.com)

**Anexo 2.** Hoja de vida del Lector 1**INFORMACIÓN PERSONAL****Nombres:** Emerson Javier Jácome Mogro**Fecha de nacimiento:** 11/06/1974**Cédula de ciudadanía:** 0501974703**Estado civil:** Casado**Número telefónico:** 0987061020**Tipo de discapacidad:** Ninguna**# De carnet CONADIS:** Ninguna**E-mail:** emerson.jacome@utc.edu.ec**FORMACIÓN ACADÉMICA****TERCER NIVEL:** U. Central del Ecuador: Ingeniero Agrónomo: Agricultura:Ecuador.**4TO NIVEL:**Maestría: U. Técnica de Cotopaxi: Magister en Gstión de la Producción.

Diplomado en educación intercultural y desarrollo sustentable.

**HISTORIAL PROFESIONAL**

Facultad Academica en la que labora: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:**

Agricultura-Investigacion

**Anexo 3.** Hoja de vida del Lector 2**INFORMACIÓN PERSONAL****Nombres:** Jorge Fabián Troya Sarzosa**Fecha de nacimiento:** 30/05/1968**Cédula de ciudadanía:** 0501645568**Estado civil:** Casado**Número telefónico:** 0995628693**Tipo de discapacidad:** Ninguna**# De carnet CONADIS:** Ninguna**E-mail:** Jorge.troya@utc.edu.ec      fabiantroya1968@hotmail.com**FORMACIÓN ACADÉMICA****Ingeniero Agrónomo** UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**Magister en la Gestión de la Producción** UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**HISTORIAL PROFESIONAL**

Facultad Académica en la que labora: Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:**

Director del Proyecto Suelos de la Universidad Técnica de Cotopaxi

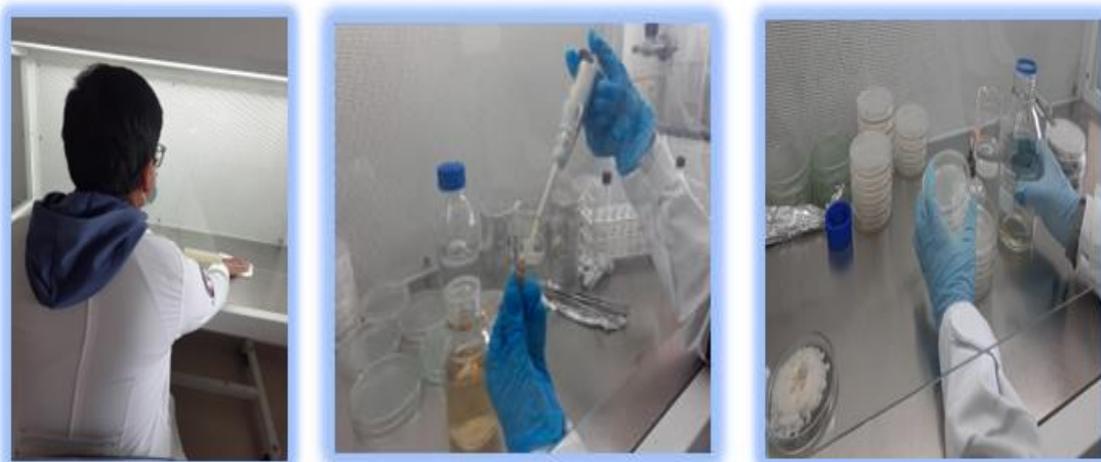
Profesor Titular Agregado.

**Anexo 4.** Hoja de vida del Lector 3**INFORMACION PERSONAL****Nombres:** Edwin Marcelo Chancusig Espín**Fecha de nacimiento:** 10/02/1962**Cédula de ciudadanía:** 0501148837**Estado civil:** Casado**Número telefónico:** 0997391825**Tipo de discapacidad:** Ninguna**# De carnet CONADIS:** Ninguna**E-mail:** edwin.chancusig@utc.edu.ec**FORMACIÓN ACADÉMICA****Ingeniero Agrónomo** UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**Magister en Desarrollo Humano y Sostenible** UNIVERSIDAD BOLIVARIANA**Magister en Gestión En Desarrollo Rural Y Agricultura Sustentable**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA-TINGO MARIA- PERÚ

**HISTORIAL PROFESIONAL****Facultad Académica en la que labora:** Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (CAREN)**AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:**

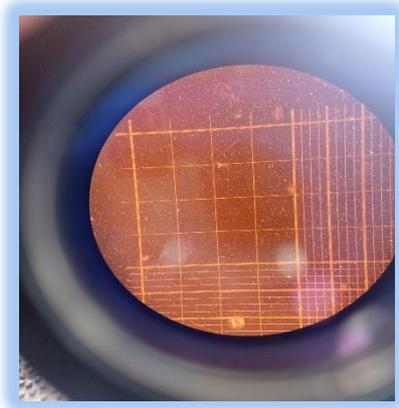
Docente de las Asignaturas de: Agroecología y Agricultura Orgánica y MIC, Seminario de Agroforestería.

**Anexo 5.** Reactivación de la cepa de *Beauveria bassiana* del Laboratorio de Agronomía**Anexo 6.** Multiplicación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el laboratorio



**Anexo 7. Elaboración de la solución madre**





**Anexo 8.** Elaboración de las concentraciones



**Anexo 9. Colecta y Preservación de las larvas**



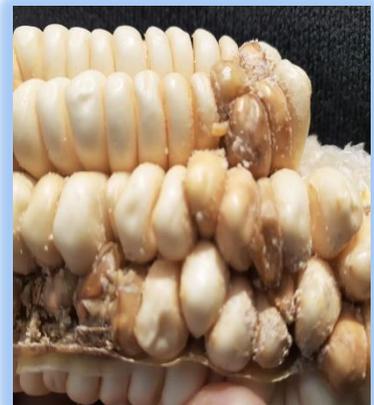
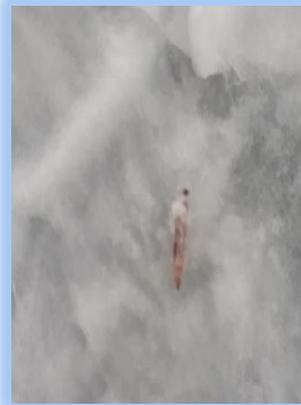
**Anexo 10. Implementación del bioensayo**



**Anexo 11.** Aplicación de *Beauveria bassiana* en cada unidad experimental



**Anexo 12.** Registro de Mortalidad de larvas de *Euxesta stigmatias* y Granos dañados

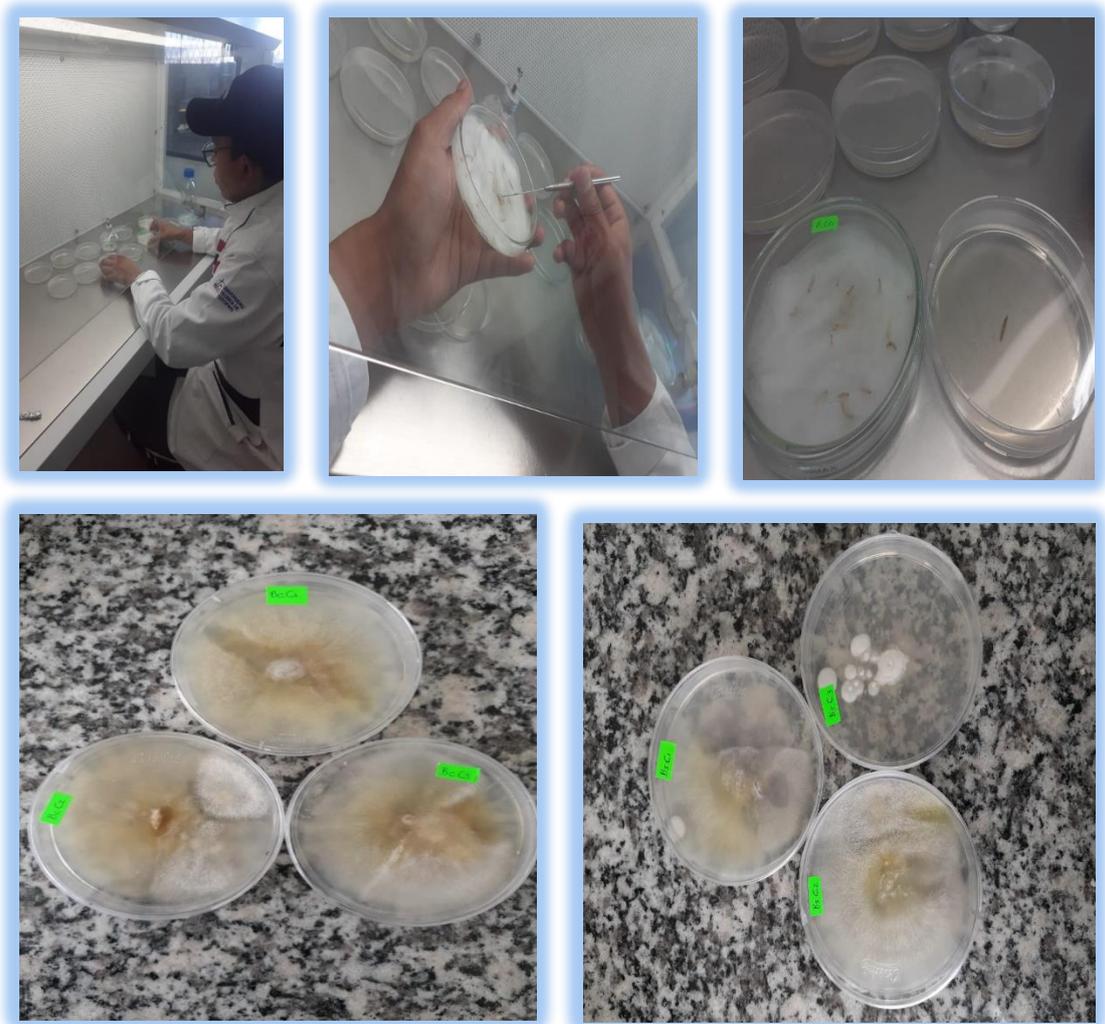


**Anexo 13.** Larvas muertas por el efecto de *Beauveria bassiana*





Anexo 14. Comprobación Re aislando *Beauveria bassiana* sobre larvas infectadas



## Anexo 15. Presupuesto general

<b>Método de Reactivación del hongo</b>				
<b>Rubro general</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
Agar PDA	Envase de 500g	1	\$ 76,16	\$ 76,16
Papel Parafilm	Rollo	1	\$ 70,73	\$ 70,73
Plástico film	Rollo 30m	1	\$ 1,50	\$ 1,50
Cajas Petri	Vidrio	5	\$ 2,50	\$ 12,50
Cajas Petri	Plástico	10	\$ 0,30	\$ 3,00
Porta bisturí	Metálico	1	\$ 2,50	\$ 2,50
Bisturís	Hoja n°14	2	\$ 0,25	\$ 0,50
Pinza	Metálico	1	\$ 2,50	\$ 2,50
Alcohol 96%	Envase de 1 litro	1	\$ 3,00	\$ 3,00
Alcohol	Envase de 300ml	1	\$ 1,00	\$ 1,00
Papel aluminio	Rollo 7m	1	\$ 2,00	\$ 2,00
Papel absorbente	Rollo 50m	1	\$ 4,50	\$ 4,50
Marcador	Tinta indeleble	1	\$ 2,25	\$ 2,25
Tijera	Plástico	1	\$ 0,45	\$ 0,45
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$ 182,09</b>
<b>Método de multiplicación del hongo</b>				
<b>Rubro general</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
Alcohol 96%	Envase de 1 litro	2	\$ 3,00	\$ 6,00
Alcohol	Envase de 300ml	2	\$ 1,00	\$ 2,00
Cloro	Sachet de 400ml	1	\$ 0,50	\$ 0,50
Antibiótico	Gentamax 280	3	\$ 1,00	\$ 3,00
Cajas Petri	Plásticas	50	\$ 0,30	\$ 15,00
Asa de cien	Metálica	1	\$ 2,50	\$ 2,50
Bisturís	Hoja n°14	5	\$ 0,25	\$ 1,25
Papel aluminio	Rollo 7m	2	\$ 2,00	\$ 4,00
Plástico film	Rollo 30m	2	\$ 1,50	\$ 3,00
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$ 37,25</b>
<b>Elaboración de las suspensiones a diferentes concentraciones y conteo de esporas.</b>				
<b>Rubro general</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
Tubos de ensayo	De vidrio	10	\$ 1,10	\$ 11,00

Agua destilada	Envase de 5lt	1	\$ 3,50	\$ 3,50
Adhesivos	Papel	1	\$ 1,00	\$ 1,00
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$ 15,50</b>
<b>Colecta y preservación de larvas</b>				
<b>Rubro general</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
Tarrinas de plástico	Paquete de 25 unidades	1	\$ 2,00	\$ 2,00
Medias nylon	Unidades	3	\$ 1,30	\$ 3,90
Cordón elástico	Metros	3	\$ 0,20	\$ 0,60
Miel	Envase de 1lt	1	\$ 2,50	\$ 2,50
Vitamina A	Cápsula líquida	1	\$ 0,30	\$ 0,30
Vitamina E	Cápsula líquida	1	\$ 0,75	\$ 0,75
Rociador	Plástico	1	\$ 0,50	\$ 0,50
Azúcar	Libras	1/2	\$ 0,35	\$ 0,35
Caja	Acrílico	1	\$ 15,00	\$ 15,00
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$ 25,90</b>
<b>Implementación del bioensayo</b>				
<b>Rubro general</b>	<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
Mazorcas de maíz	½ quintal	1	\$ 4,00	\$ 4,00
Tarrinas de plástico	Paquetes de 25 unidades	2	\$ 3,80	\$ 7,60
Medias nylon	Unidades	7	\$ 1,30	\$ 9,10
Cordón elástico	Metros	10	\$ 0,20	\$ 2,00
Rociadores	Plástico	2	\$ 0,50	\$ 1,00
Algodón	Paquetes	2	\$ 2,00	\$ 4,00
Agua purificada	Envase de 1gal	1	\$ 1,80	\$ 1,80
Jeringuilla	De 10ml	1	\$ 0,50	\$ 0,50
Estilete	Plástico	1	\$ 1,00	\$ 1,00
Cinta doble faz	Rollo	2	\$ 1,50	\$ 3,00
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$ 34,00</b>
<b>Total</b>				<b>\$ 294,74</b>

**Anexo 16.** Protocolo de laboratorio para el manejo del hongo entomopatógeno



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**PROTOCOLO DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DEL HONGO  
ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*.**

**Autor:**

Caiza Jarrin Andy Mauricio

**Tutora:**

Toapanta Gallegos Diana Elizabeth Ing. Mg.

**Latacunga - Ecuador**

**Abril – Agosto 2022**

## INDICE DE CONTENIDO

<b>1. PROTOCOLO DE REACTIVACIÓN</b> .....	68
<b>2. PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN</b> .....	69
<b>3. PROTOCOLO DE LA ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE Y FASE DE CONTEO.</b> .....	71
<b>3.1. Solución madre</b> .....	71
<b>3.2. Conteo de esporas</b> .....	72
<b>4. PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES</b> ....	73
<b>5. PROTOCOLO PARA LA APLICACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO</b> 74	
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	75

## ÍNDICE DE IMAGENES

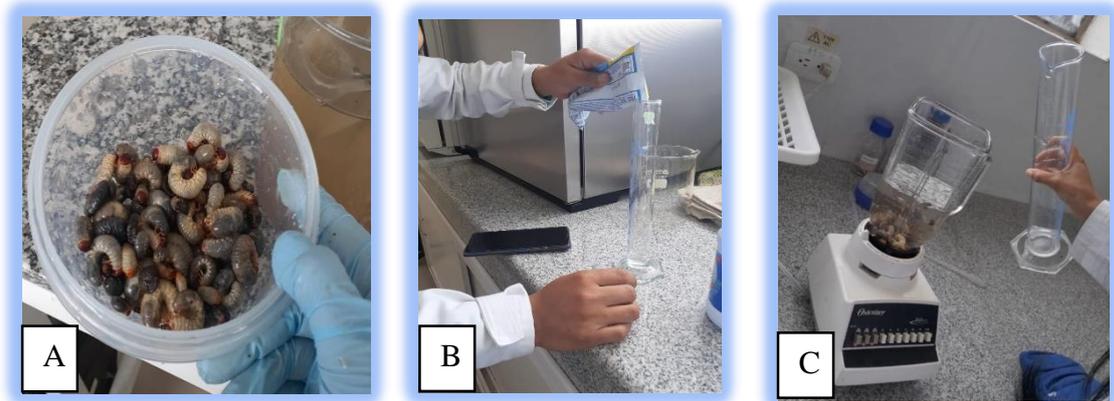
<b>Imagen 1.</b> A) Insectos recolectados. B) Desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5%. C) Extracto de cutzos. D) Mezcla de AGAR AGAR y Glucosa. E) Dispensar el extracto de cutzos en las cajas Petri. F) Reactivación de la cepa. ....	68
<b>Imagen 2.</b> A) Desinfección de la cámara de flujo laminar. B) PDA suplementado con antibiótico. C) Dispensar en las cajas Petri en el medio de cultivo. D) Cortes de 5mm colocados en PDA. E) Cajas Petri del hongo entomopatógeno. ....	70
<b>Imagen 3.</b> A) Prueba para determinar la cantidad de suspensión. B) Raspado del hongo. C) Suspensión madre. D) Colocar el reactivo Tween 80. E) Cámara de Neubauer. F) Vista 40x de la Cámara de Neubauer. ....	73
<b>Imagen 4.</b> A) Selección y raspado del hongo. B) Suspensión madre. C) Diluciones agitadas. D) Conteo de esporas para las diferentes diluciones. E) Concentraciones alcanzadas de B. bassiana costa. F) Concentraciones alcanzadas de B. bassiana sierra. ....	74
<b>Imagen 5.</b> A) Toma de la concentración. B) Concentración colocada en un tubo de ensayo. C) Solución colocada en un rociador. D) Aplicación. ....	75

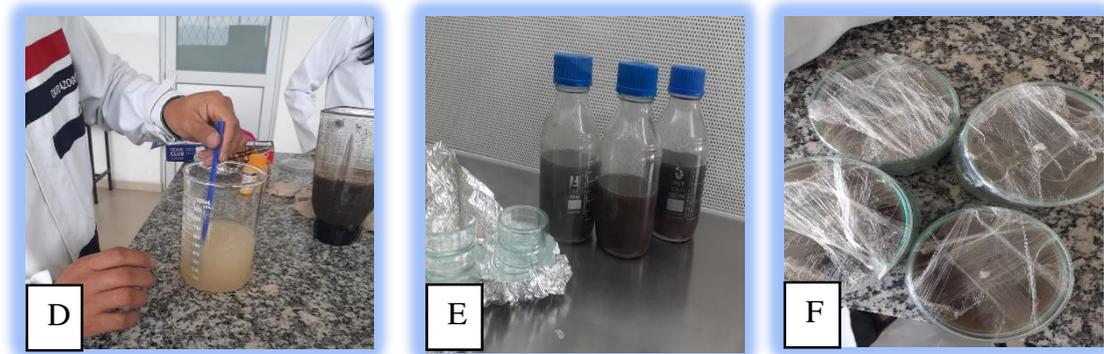
## 1. PROTOCOLO DE REACTIVACIÓN

Para la reactivación del hongo se empleó la metodología utilizada por (Chiriboga, Gómez, & Garcés, 2015) donde mencionan que, se debe seleccionar insectos activos, que se encuentren vivos al momento de ser recolectados (*Phyllophaga sp.*).

A continuación, se detalla el procedimiento de esta metodología que se realizó en el Laboratorio de Agronomía:

- 1.- Se debe desinfectar los insectos con hipoclorito de sodio al 0.5% en 500mL de agua destilada.
- 2.- Después se deben sumergir los insectos de 5 a 10 minutos.
- 3.- Pesar 18gr de AGAR AGAR, luego se debe pesar 15gr de Glucosa, después se debe pesar 70gr de insectos (cutzos).
- 4.- En un vaso de precipitación de 500mL colocar agua destilada, los 18gr de AGAR AGAR y los 15gr de Glucosa.
- 5.- Después se debe colocar a los cutzos en una licuadora, añadir 500mL de agua destilada y se procede a licuar.
- 6.- Posteriormente con un cernidor o una coladera se cierne el extracto y se coloca en un vaso de precipitación de 1000mL.
- 7.- Finalmente se debe traspasar a los frascos graduados 400mL del extracto para realizar el medio de cultivo AGAR INSECTO.





**Imagen 1.** A) Insectos recolectados. B) Desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5%. C) Extracto de cutzos. D) Mezcla de AGAR AGAR y Glucosa. E) Dispensar el extracto de cutzos en las cajas Petri. F) Reactivación de la cepa.

## 2. PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN

Se utilizó la metodología empleada por (Castillo & Choquetarqui, 2012) mencionando que las muestras obtenidas a partir del AGAR INSECTO se las debe colocar en PDA realizando cortes rectangulares de 5mm con un bisturí suplementado de un antibiótico a base de Gentamicina, sellado con cinta Parafilm y finalmente este debe ser colocado dentro de la cámara de incubación.

A continuación, se detalla los pasos desarrollados y materiales utilizados para la multiplicación de *Beauveria bassiana*:

1.- Se prepara PDA (Papa Dextrosa Agar) mediante cálculos recomendados tanto para el agua destilada y para el PDA.

- Cantidad para el agua destilada: 100mL a razón de 5 cajas Petri.
- Cantidad para el agar: 39gr a razón de 1000mL de agua destilada.

2.- Se debe esterilizar el medio de cultivo en la autoclave con los materiales utilizados en este caso son pinzas, porta bisturís, cajas Petri de vidrio y azas por un período de tiempo de 45 minutos.

3.- Seguidamente se desinfecta con cloro y después con alcohol la cámara de flujo laminar, una vez que el medio y los materiales se encuentren esterilizados se los coloca en la cámara.

4.- Luego de que el medio de cultivo es llevado a la cámara de flujo laminar se deja enfriar el mismo a temperatura ambiente y se coloca el antibiótico, en este caso se debe utilizar

“Gentamax 280” en su presentación de ampolla, el mismo que debe ser mezclado con el medio de cultivo y después se dispensa en cada caja Petri.

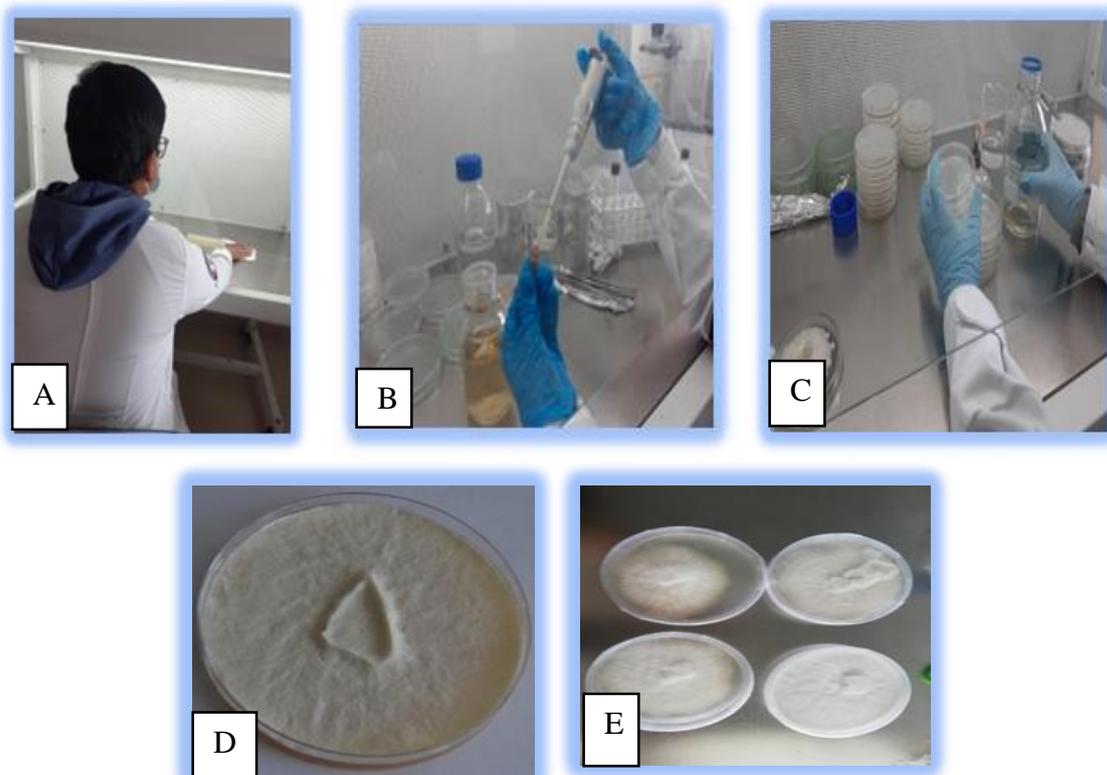
5.- De la caja Petri que contienen los cultivos desarrollados, se debe realizar un corte con un bisturí de la parte que contenga mayor porción del micelio blanco y con una pinza se retira el pedazo cortado y se lo coloca en la caja Petri, también se debe realizar frotis en algunas cajas Petri, luego se coloca una cinta Parafilm y se identifica la caja Petri, y finalmente se coloca en la cámara de incubación a una temperatura promedio de 24°C.

6.- Al transcurso de 7 días se debe observar la caja Petri cubierta con *B. bassiana*. La misma que va a ser considerada como el primer subcultivo.

7.- Al obtener el primer subcultivo limpio y sin ninguna contaminación, se prepara nuevamente medio de cultivo suplementado con el antibiótico antes mencionado.

8.- Del subcultivo de *Beauveria. bassiana* se realiza unos cortes de 5 mm con el bisturí y cada corte se coloca en una caja Petri respectivamente, después se debe sellar con una cinta Parafilm y se identifica por fechas después de haberse sembrado.

9.- Finalmente se debe envolver en papel film para evitar contaminaciones, se coloca las cajas en la cámara de incubación y al transcurso de 7 días se observa que las nuevas cajas estaban cubiertas con *B. bassiana*.



**Imagen 2.** A) Desinfección de la cámara de flujo laminar. B) PDA suplementado con antibiótico. C) Dispensar en las cajas Petri en el medio de cultivo. D) Cortes de 5mm colocados en PDA. E) Cajas Petri del hongo entomopatógeno.

### 3. PROTOCOLO DE LA ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE Y FASE DE CONTEO.

Previo a la aplicación en las unidades experimentales, se debe realizar una prueba para determinar la cantidad de suspensión de conidias que debe alcanzar toda el área de una mazorca.

Para la elaboración de esta fase se empleó la metodología utilizada por (Antía & Posada, 1992) quienes mencionan que, para la preparación de la solución madre se debe realizar con un volumen de Agua Destilada Estéril a razón de 240mL y el hongo producido en las cajas Petri de plástico y de vidrio.

#### 3.1. Solución madre

A continuación, se detalla la elaboración de los pasos a seguir para la solución madre:

- 1.- Se debe seleccionar 5 cajas Petri de las cepas de *Beauveria bassiana* nativa de la sierra y 7 cajas Petri de las cepas de *Beauveria bassiana* nativa de la costa, para ello se selecciona micelio con sus características como su coloración, esporulación y sin contaminación.
- 2.- En cada una de las cajas Petri se coloca agua destilada estéril seguidamente se realiza un raspado sobre el hongo con la ayuda de una aza metálica.
- 3.- El resultado del raspado del hongo de cada caja Petri se lo deposita en un vaso de precipitación de 500mL.
- 4.- Finalmente a estas soluciones se le debe colocar el reactivo Tween 80 para un mejor conteo de esporas, para ello se realizó el siguiente cálculo:

$$C_1 \cdot v_1 = C_2 \cdot v_2$$

Donde:

$C_1$  = A la concentración de la solución inicial que tenemos.

$V_1$  = Al volumen que se debe utilizar para la dilución.

$C_2$  = A la concentración que deseamos alcanzar.

$V_2$  = Al volumen final de la dilución.

Para ello se calculó de la siguiente manera:

### 3.2. Conteo de esporas

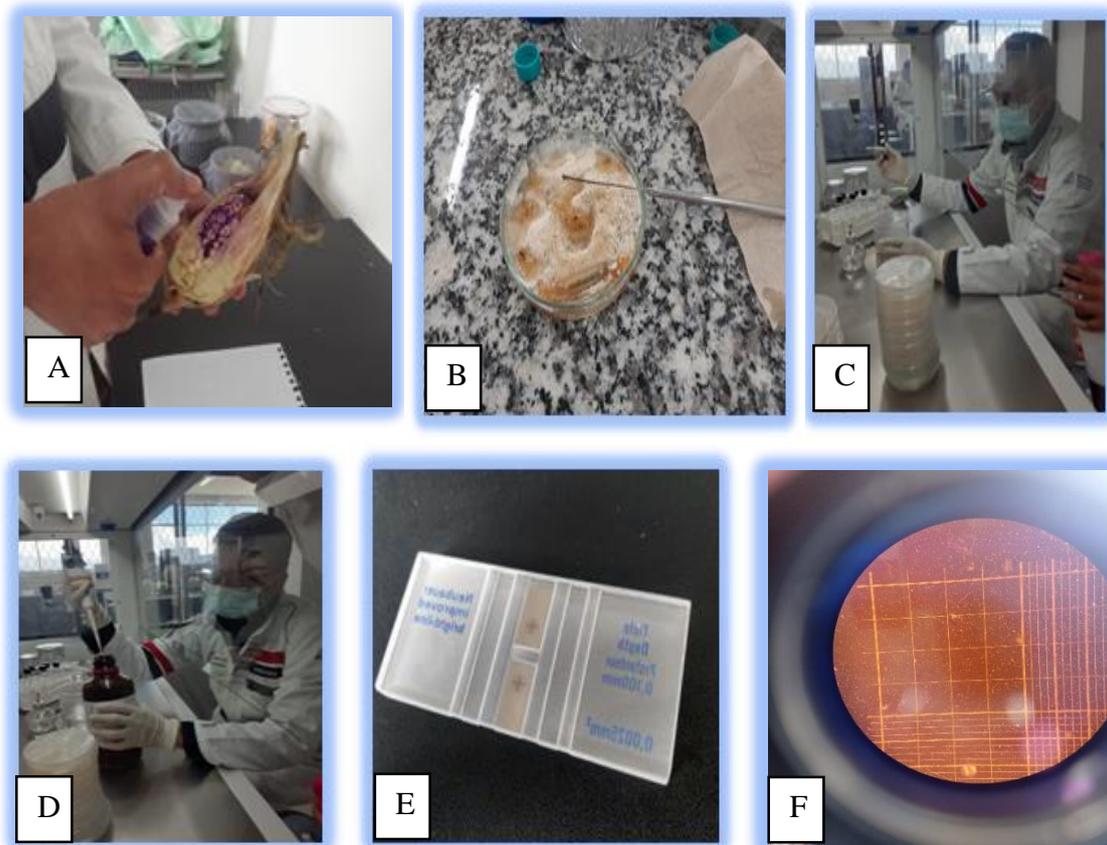
Para el conteo de esporas de las cepas de *Beauveria bassiana* nativas se detallan los siguientes pasos:

- 1.- Una vez colocado el reactivo Tween 80 a razón de 150<sub>uL</sub> en las soluciones madres se procede a mezclar hasta obtener una mezcla homogénea algo espumosa hasta que se disuelva todo el reactivo. Esto se realiza para dispersar las esporas del hongo y así se nos facilite el conteo.
- 2.- A las soluciones madres de *Beauveria bassiana* nativas se debe agitar durante 4 minutos en el agitador a 300 rpm (revoluciones por minuto) con el fin de volver a tener esa mezcla homogénea ya mencionada.
- 3.- Con la ayuda de una micropipeta o pipeta volumétrica se extrae 60<sub>uL</sub>, luego se coloca en la cámara de Neubauer, después se debe tapar con un cubre objetos y finalmente se observa en el lente de 40x en el microscopio.
- 4.- Para el conteo de esporas se debe realizar en forma de zigzag por cada cuadrante. Únicamente se cuenta las esporas que se encuentran al interior de cada cuadrante y se descarta las esporas que se encuentran fuera de las divisiones.

A continuación, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo de esporas} = \frac{\# \text{ total de esporas}}{\# \text{ de cuadrantes contabilizados}} \times \frac{10.000}{\# \text{ de subcuadrantes contabilizados}}$$

**Nota:** En el caso de haber diluciones multiplicar por las veces realizadas de las mismas.

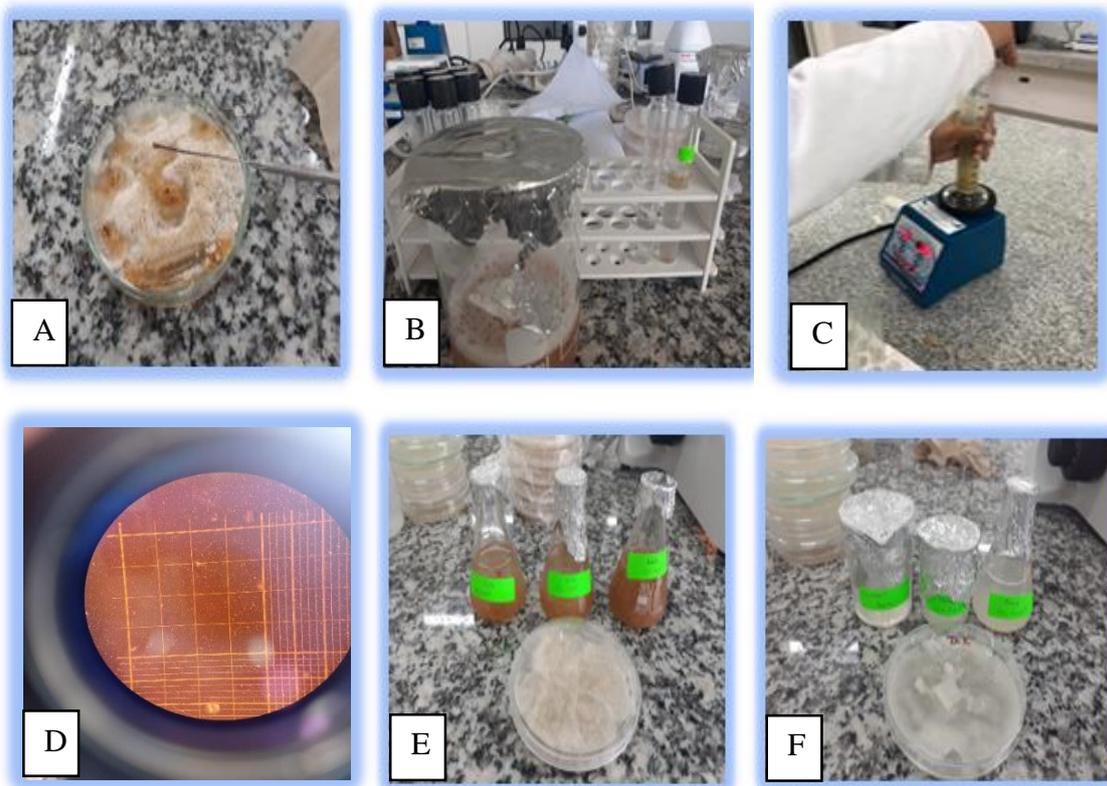


**Imagen 3.** A) Prueba para determinar la cantidad de suspensión. B) Raspado del hongo. C) Suspensión madre. D) Colocar el reactivo Tween 80. E) Cámara de Neubauer. F) Vista 40x de la Cámara de Neubauer.

#### 4. PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES

Una vez que la concentración de la solución madre se determine se procede hacer las siguientes diluciones para las demás concentraciones.

- 1.- Con la ayuda de una gradilla en cuatro tubos de ensayo (1, 2, 3, 4) se coloca 9mL de agua destilada estéril.
- 2.- Después se debe realizar diluciones con la ayuda de una micropipeta, se extrae 1mL de la suspensión madre y se coloca en el tubo de ensayo 1, luego de la dilución 1 se extrae 1mL y se coloca en el tubo de ensayo 2, posteriormente de la dilución 2 se extrae 1mL y se coloca en el tubo de ensayo 3 y finalmente de la dilución 3 se extrae 1mL y se coloca en el tubo de ensayo 4, esta fue la última dilución. Las mismas que deben ser sometidas a un agitador.
- 3.- Finalmente se realiza el conteo de esporas por cada dilución, dando así las siguientes concentraciones para cada *Beauveria* nativa:  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ .



**Imagen 4.** A) Selección y raspado del hongo. B) Suspensión madre. C) Diluciones agitadas. D) Conteo de esporas para las diferentes diluciones. E) Concentraciones alcanzadas de *B. bassiana* costa. F) Concentraciones alcanzadas de *B. bassiana* sierra.

## 5. PROTOCOLO PARA LA APLICACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO

La metodología para la aplicación se debe hacer de la siguiente manera:

- 1.- Se toma 10ml de cada concentración y se deposita en un rociador.
  - 2.- Luego se procede a fumigar cada unidad experimental de acuerdo al diseño establecido.
- Este proceso se debe utilizar para las fumigaciones de la *Beauveria* nativa (costa y sierra) con una aplicación de forma preventiva.





**Imagen 5.** A) Toma de la concentración. B) Concentración colocada en un tubo de ensayo. C) Solución colocada en un rociador. D) Aplicación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Antía, O., & Posada, F. (1992). Produccion en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del cafe. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/233957052>
- Castillo, C., & Choquetarqui, D. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. Obtenido de <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/academia/v11n23/art08.pdf>
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatígeno para el control biológico de hormigas cortadoras (YSAÚ). Obtenido de <file:///C:/Users/Andy/Downloads/Chiriboga%20et%20al.,%202015.pdf>

**Anexo 17.** Aval de traducción