



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

Título:

**“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN
CULTIVO MONOSPÓRICO PARA EL CONTROL DE GALLINA
CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO
CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2022.”**

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

Autor:

Azogue Gavilanez Wellington David

Tutor:

Chancusig Espín Edwin Marcelo, Ing. Ph.D.

Co-tutora

Llanos Proaño Tannya Elizabeth, Ing. Mg.

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Wellington David Azogue Gavilanez, con cédula de ciudadanía No. 0504356007, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Evaluación de *Beauveria Bassiana* a partir de un cultivo monospórico para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), en condiciones de laboratorio campus Salache, Latacunga, Cotopaxi 2022.” siendo el Ingeniero Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín PhD. Tutor 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, 22 de agosto del 2022

Wellington David Azogue Gavilanez

Estudiante

CC: 0504356007

Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

Docente Tutor

CC: 0501148837

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 **AZOGUE GAVILANEZ WELLINGTON DAVID** identificado con cédula de ciudadanía **0504356007** 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 “Evaluar *Beauveria Bassiana* a partir de un cultivo monospórico para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), en condiciones de laboratorio campus Salache, Latacunga, Cotopaxi 2022”, 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: Abril - agosto 2018

Finalización de la carrera: Abril - agosto 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 3 de junio del 2022

Tutor: Ingeniero Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig Espín

Tema: “Evaluación de *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monospórico para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), en condiciones de laboratorio campus Salache, Latacunga, Cotopaxi 2022”

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:

- a) 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.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) 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 **LA 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 22 días del mes de agosto del 2022.

Wellington David Azogue Gavilanez

EL CEDENTE

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOSPÓRICO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2022.”, de Azogue Gavilanez Wellington David 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, 22 de agosto del 2022

Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

DOCENTE TUTOR

CC: 0501148837

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: Azogue Gavilanez Wellington David, con el título del Proyecto de Investigación: “EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOSPÓRICO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO 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, 22 de agosto del 2022

Lector 1 (Presidente)

Ing. Guido Euclides Yauli Chicaiza, Mg.

CC: 0501604409

Lector 2

Ing. Castillo De La Guerra Clever Gilberto, Mg.

CC: 0501715494

Lector 3

Ing. Cristian Santiago Jiménez Jácome, Mg.

CC: 0501946263

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por cuidarme y enseñarme caminos de bien, por la vida, por la salud y por haberme otorgado una familia maravillosa, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo, han fomentado en mí el deseo de superación y de triunfo en la vida.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por abrirme las puertas durante estos años de mi formación académica como profesional.

A mis amigos Kateryn Caillagua, Fernanda Caiza y Mauricio Caiza por ser personas admirables.

A todos los docentes quienes conforman la carrera de Agronomía, por aportar con sus conocimientos y en especial al Ing. Edwin Chancusig docente tutor de mi proyecto y a la Ing. Tania Llanos quienes contribuyeron al desarrollo de esta investigación.

Wellington David Azogue G.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a Dios por darme la vida, a toda mi familia que siempre me brindaron su apoyo y cariño.

A mi madre Amelida Gavilanez por su apoyo incondicional, amor, esfuerzo y valentía.

A mi padre Enrique Azogue por ser un hombre admirable, lleno de virtudes quien con su amor, paciencia y sabiduría formo al hombre que soy hoy en día, enseñándome a valorar la vida, que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

David

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOSPÓRICO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2022.”

AUTOR: Azogue Gavilanez Wellington David

RESUMEN

Entre las plagas más importantes del cultivo de maíz está la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), siendo un insecto que causa daño a las raíces, provocando la muerte hasta un 50% de las plantas en la primera fase de crecimiento. El propósito de la investigación fue determinar la mejor concentración de *Beauveria bassiana* e identificar el mejor sustrato para el comportamiento del hongo, planteado un método de control biológico para el insecto. La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con un arreglo factorial de A x B + 1 adicional con siete tratamientos y cuatro repeticiones, donde los factores en estudio fueron; Factor A concentraciones de *Beauveria bassiana* (10^8 , 10^9 , 10^{10} conidios/ml) y Factor B (sustrato esterilizado y no esterilizado) obteniendo un total de 28 unidades experimentales con 10 larvas de (*Phyllophaga spp.*) por cada unidad experimental. Las variables determinadas fueron porcentaje de mortalidad y concentración de conidios/ml 10^8 , 10^9 , 10^{10} . Los resultados obtenidos mediante un ADEVA fueron los tratamientos, concentraciones y las interacciones de los factores A y B que dieron altamente significativos, en lo cual se planteó pruebas de Tukey al 5% para determinar que tratamiento esta de repunte, el análisis del Factor B no fue significativo. El resultado para el porcentaje de mortalidad se determinó en el tratamiento seis (T6) que corresponde a la aplicación de *Beauveria bassiana* con una concentración de 10^{10} conidios/ml en el sustrato no esterilizado, alcanzando un 95% de mortalidad, siendo la mejor en comparación con el adicional que no presento larvas muertas. Por lo tanto se concluye que la mejor concentración fue 10^{10} conidios/ML en suelo no esterilizado.

Palabras clave: *Phyllophaga spp*, *Beauveria bassiana*, concentraciones, mortalidad

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

TITLE: "EVALUATION OF *Beauveria bassiana* FROM A MONOSPORIC CULTURE FOR THE CONTROL OF BLIND HEN (*Phyllophaga spp.*), IN LABORATORY CONDITIONS CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2022."

AUTHOR: Azogue Gavilanez Wellington David

ABSTRACT

Among the most important pests of corn cultivation is the blind hen (*Phyllophaga spp.*), being an insect that causes damage to the roots, causing the death of up to 50% of the plants in the first phase of growth. The purpose of the research was to determine the best concentration of *Beauveria bassiana* and identify the best substrate for the behavior of the fungus, proposed a method of biological control for the insect. The present research was carried out in the Agronomy Laboratory of the Technical University of Cotopaxi, a completely random block design (DBCA) was used with a factorial arrangement of A x B + 1 additional with seven treatments and four repetitions, where the factors under study were; Factor A concentrations of *Beauveria bassiana* (10^8 , 10^9 , 10^{10} conidia/ml) and Factor B (sterilized and unsterilized substrate) obtaining a total of 28 experimental units with 10 larvae of (*Phyllophaga spp.*) for each experimental unit. The variables determined were percentage of mortality and concentration of conidia/ml 10^8 , 10^9 , 10^{10} . The results obtained by means of an ADEVA were the treatments, concentrations and interactions of factors A and B that gave highly significant, in which Tukey tests were proposed at 5% to determine which treatment is rebound, the analysis of Factor B was not significant. The result for the percentage of mortality was determined in treatment six (T6) that corresponds to the application of *Beauveria bassiana* with a concentration of 10^{10} conidia / ml in the unsterilized substrate, reaching 95% mortality, being the best compared to the additional one that did not present dead larvae. Therefore it is concluded that the best concentration was 10^{10} conidia/ML in unsterilized soil.

Keywords: *Phyllophaga spp.*, *Beauveria bassiana*, concentrations, mortality

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AVAL DEL TUTOR 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 FIGURAS	xv
INDICE DE ANEXOS	xvi
CAPITULO I	1
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	3
4.1 Beneficiarios Directos	4
4.2 Beneficiarios Indirectos	4
5. PROBLEMÁTICA	4
6. OBJETIVOS	5
6.1 Objetivo General	5
6.2 Objetivos Específicos	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS	5

CAPITULO II	8
8. FUNDAMENTACIÓN TEÒRICA	8
8.1 Antecedentes de investigación	8
8.2 Gallina Ciega (<i>Phyllophaga</i> spp.)	9
8.3 Taxonomía de <i>Phyllophaga</i> spp.	10
8.4 Ciclo de vida de <i>Phyllophaga</i> spp.	11
8.5 Daños provocados por <i>Phyllophaga</i> spp.	12
8.6 Métodos de control	13
8.6.1 Control Químico	13
8.6.2 Control Biológico	13
8.6.3 Control Cultural	13
8.7 Hongos entomopatógenos	14
8.8 <i>Beauveria Bassiana</i>	14
8.9 Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	15
8.10 Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i>	16
8.11 Morfología de <i>Beauveria bassiana</i>	16
8.12 Bioplagueisidas	17
8.13 Medios de cultivo	18
8.14 Cámara de Neubauer	18
CAPITULO III	18
9 HIPÓTESIS	18
10 METODOLOGÍA	18
10.1 Ubicación del ensayo	18
10.2 Tipo de investigación	19
10.2.1 Experimental	19
10.2.2 Cuantitativa	20

10.3	Modalidad básica de investigación	20
10.3.1	De laboratorio	20
10.3.2	Bibliográfico	20
10.4	Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	20
10.4.1	Análisis estadístico	20
10.4.2	Registro de datos	20
10.5	Materiales	20
10.5.1	Materia Prima	20
10.5.2	Reactivos	21
10.5.3	Materiales de Laboratorio	21
10.5.4	Materiales para la Investigación	21
10.6	Equipos	21
10.7	Diseño Experimental	21
10.7.1	Unidad experimental	22
10.7.2	Factor en estudio	22
10.7.3	Tratamiento en estudio	22
10.7.4	Distribución del ensayo	23
10.7.5	ADEVA	23
10.8	Variables a evaluar	24
10.9	Metodología de multiplicación	24
10.9.1	Preparación del medio de cultivo	24
10.9.2	Incubación	25
10.9.3	Morfología	25
10.10	Preparación de solución madre	25
10.10.1	Esterilización	25
10.10.2	Cosecha de micelios	25

10.10.3	Preparación de concentraciones	25
10.10.4	Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en la cámara de Neubauer)	26
10.11	Colecta de larvas (<i>Phyllophaga spp.</i>)	26
10.12	Implementación del ensayo	27
10.12.1	Exposición del hongo en las larvas	27
10.12.2	Evaluación del ensayo	27
10.12.3	Identificación de los insectos muertos	27
CAPITULO IV		28
11	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CAPITULO V		32
12	CONCLUSIONES	32
13	RECOMENDACIONES	32
14	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
15	ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y sistemas en relación a los objetivos -----	5
Tabla 2. Taxonomía de Phyllophaga spp. -----	10
Tabla 3. Ciclo de vida de Phyllophaga spp. -----	11
Tabla 4. Taxonomía de Beauveria bassiana -----	15
Tabla 5. Ubicación geográfica de la Investigación -----	19
Tabla 6. <i>Tratamientos, código, descripción</i> -----	22
Tabla 7. Distribución del ensayo -----	23
Tabla 8. Esquema del Adeva -----	23
Tabla 9. Variable a evaluar -----	24
Tabla 10. Análisis de Varianza del porcentaje de mortalidad -----	28
Tabla 11. Contrastes Ortogonales Adicional vs Tratamiento -----	29
Tabla 12. Pruebas de Tukey para el Factor A -----	30
Tabla 13. Pruebas de Tukey al 5% para los Factores A*B -----	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (Phyllophaga spp.) en estado de larva -----	10
Figura 2. Beauveria bassiana en el control biológico de Insectos -----	15
Figura 3. Ubicación del Campus Salache -----	19
Figura 4. Cámara de Neubauer -----	26
Figura 5. Esporulación de Beauveria bassiana en gallina ciega -----	27

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Hoja de vida del Alumno (David Azogue) -----	37
Anexo 2. Hoja de vida del Docente Tutor (Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg.) -----	39
Anexo 3. Hoja de vida del lector 1 (Ing. Guido Euclides Yauli Chicaiza, Mg.) -----	40
Anexo 4. Hoja de vida del lector 3 (Ing. Santiago Jiménez) -----	41
Anexo 5. Análisis Taxonómico de <i>Beauveria bassiana</i> -----	42
Anexo 6. Presupuesto -----	44
Anexo 7. Medios de cultivo para la multiplicación del hongo <i>Beauveria bassiana</i> . -----	46
Anexo 8. Acondicionamiento de la gallina ciega (<i>Phyllophaga</i> spp.)-----	46
Anexo 9. Implementación del ensayo experimental. -----	47
Anexo 10. Multiplicación del hongo <i>Beauveria bassiana</i> . -----	47
Anexo 11. Preparación de la solución para conteo de conidios mediante soluciones seriadas. -----	47
Anexo 12. Suspensión de <i>Beauveria bassiana</i> y elaboración de la solución madre para aplicación. ---	48
Anexo 13. Aplicación de las diferentes concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> en el ensayo. -----	48
Anexo 14. Libro de campo -----	48
Anexo 15. Canteo de gallina ciega (<i>Phyllophaga</i> spp.) entre vivas y muertas. -----	49
Anexo 16. Síntomas que presento (<i>Phyllophaga</i> spp.) después de la senescencia. -----	49
Anexo 17. Verificación de la muerte de las larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.) por <i>Beauveria bassiana</i> -----	49
Anexo 18. Protocolo -----	50
Anexo 19. Aval de Traductor -----	62

CAPITULO I

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Evaluación de *Beauveria Bassiana* a partir de un cultivo monospórico para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), en condiciones de laboratorio campus Salache, Latacunga, Cotopaxi 2022.

Fecha de Inicio:

04 de Abril del 2022

Fecha de finalización:

Agosto 2022

Lugar de ejecución:

Salache Bajo – Eloy Alfaro – Latacunga – Cotopaxi – Universidad Técnica de Cotopaxi

Facultad que auspicia:

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Agronomía

Proyecto de investigación vinculado:

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

Proyecto:**Equipo de Trabajo:**

Responsable del proyecto: Wellington David Azogue Gavilanez

Tutor: Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín Ph.D.

Lector 1: Ing. Yauli Chicaiza Guido Euclides, Mg.

Lector 2: Ing. Castillo de la Guerra Clever Gilberto Mg.

Lector 3: Ing. Cristian Santiago Jiménez Jácome Mg.

Coordinador del proyecto:

Nombre: Wellington David Azogue Gavilanez

Teléfonos: 0987109170

Correo electrónico: wellington.azogue6007@utc.edu.ec

Área de conocimiento:

Agricultura – Agricultura, silvicultura y pesca – producción agropecuaria

Línea de Investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local

Esta línea está enfocada en la generación del 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 los recursos naturales biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano y social.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

En el presente proyecto de investigación se evaluó el control del patógeno conocido comúnmente como gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), un gusano que afecta a una variedad de cultivos y que ha causado grandes pérdidas a nivel de la producción, con el hongo entomopatógeno *Beauveria Bassiana* obtenido y multiplicado de un cultivo puro, siendo así un hongo que produce toxinas y tiene la capacidad de romper el sistema inmune de un patógeno por lo que puede ser utilizado como un agente biocontrolador.

3. JUSTIFICACIÓN

En la presente investigación se busca diagnosticar la efectividad de *Beauveria bassiana* en el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) considerado como plaga para los agricultores de la zona.

Para el efecto se obtendrá información de proyectos ya realizados con el hongo entomopatógeno, previo a esto se dará la pauta para generar recomendaciones que permitan prevenir y controlar los insectos con mayor índice de daños de una manera biológica, que no afecten la calidad del suelo con químicos y la contaminación del medio ambiente posteriormente se obtendría como resultado disminución de pérdidas en la producción y recursos económicos.

El control biológico toma un papel relevante dentro de las estrategias MIPE, mediante la utilización de productos derivados de organismos vivos y tiene una aplicabilidad muy amplia en la producción agrícola, ya que no solo se limita al combate de plagas, sino que también se utiliza para combatir hongos, bacterias y nematodos. (Brenes Madriz, 2020). Entre los productos microbiológicos destacan los hongos y bacterias entomopatógenos, siendo los hongos los que más efecto tienen en el proceso de combate de plagas, ya que las condiciones ambientales pueden favorecer o disminuir su acción. Entre las clases de hongos entomopatógenos, tenemos los Hyphomycetes, que incluye al *Beauveria bassiana*, que se utiliza para el control de esta plaga. (Brenes Madriz, 2020).

Al determinar la eficacia de *Beauveria bassiana* en el control de Gallina ciega y como se enfrentan los agricultores a este problema será de gran importancia para planes de manejos eficientes y amigables con el medio ambiente, además, se aportara información para entidades que velan por el progreso de la agricultura ecuatoriana. Los beneficiarios de esta investigación serán los propios productores, ya que obtendrán de la atención de las entidades gubernamentales que a pesar de ayudar contantemente a los productores, aun no tiene una idea clara de cómo afecta este problema al nivel de vida de las personas.

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los beneficiarios de esta investigación serán los agricultores que tienen el problema en el cultivo de maíz, frijol, trigo, papa, caña de azúcar y flores; en las zonas más propensas al desarrollo de esta plaga.

4.1 Beneficiarios Directos

En el ámbito académico y bibliográfico a la Universidad Técnica de Cotopaxi, a los estudiantes de la Carrera de Ingeniería Agronómica quienes realizan continuamente su trabajo práctico dentro del proyecto institucional, investigadores que podrán basarse en la información obtenida para su posterior investigación así mismo se beneficiarán los productores agrícolas del sector Salache y público en general.

4.2 Beneficiarios Indirectos

Sirve de información referencial, para instituciones públicas como privadas que desarrollen sus actividades en el ámbito de biocontroladores puesto que esta investigación está siendo de interés para proyectos posteriores de ejecución, productos agrícolas y los mismos agricultores.

5. PROBLEMÁTICA

La gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), es un insecto que causa daño a las raíces de una extensa variedad de cultivos y pérdidas económicas en los productos que son de gran significado; en el cultivo de maíz, puede causar la muerte hasta un 50% de las plantas.

Este tipo de plaga está asociado a daños de gran volumen en las raíces de los cultivos, puede llegar a ser destructor. No tiene límite de cultivo y ataca desde pastos, hortalizas y especies forestales hasta ornamentales. El daño ocasionado en las raíces abarca todo el sistema radicular, llegando a provocar en condiciones extremas la muerte del cultivo, (Brenes Madriz, 2020).

Ecuador, considerado entre los diecisiete países mega diversos del mundo que tiene enormes recursos naturales, también ha sufrido un gran impacto de las actividades agropecuarias. En Ecuador los ataques de Gallina ciega se han generalizado en todas las zonas agroecológicas del país, especialmente en la Región Serra, en lugares de clima frío y templado donde se encuentra cultivos de ladera. Las larvas se alimentan principalmente de materia orgánica en descomposición al inicio, y posteriormente de raíces de pastos, maíz, fique, tomate, café, espárragos y plantas ornamentales, (SILVA, 2015).

El cultivo de maíz es utilizado de preferencia por productores para el trabajo de cultivos de ciclo corto, en la provincia de Los Ríos es la que más hectáreas destina al cultivo de esta

gramínea, y no es raro observar que las áreas de siembras permanezcan sin cultivar en épocas no convenientes para el maíz, la presencia de insectos-plagas se hace más fácil en la gran mayoría de los cultivos, convirtiéndose así muy costoso el control, dejando además de pérdidas en los rendimientos, elevados costos de producción que se elevan en gran cantidad por el uso de pesticidas que permitan disminuir el daño de los insectos, (Contreras, 2019).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Evaluar *Beauveria Bassiana* a partir de un cultivo monospórico para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp*), en condiciones de laboratorio campus Salache, Latacunga, Cotopaxi 2022.

6.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la mejor concentración de *Beauveria bassiana* para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).
- Identificar el mejor sustrato (esterilizado – no esterilizado), en el comportamiento de *Beauveria bassiana*.
- Determinar la mortalidad de Gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) por la acción de *Beauveria bassiana*.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

Tabla 1. Actividades y sistemas en relación a los objetivos

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADO	MEDIO DE VERIFICACIÓN
OBJETIVO 1 Determinar la mejor concentración de <i>Beauveria bassiana</i> para el	-Ubicación de materiales en la autoclave para su desinfección.	-Materiales esterilizados. -Subcultivos del hongo	-Fotografías -Cajas Petri con <i>Beauveria bassiana</i> .

<p>control de gallina ciega (<i>Phyllophaga spp.</i>).</p>	<p>-Multiplicación <i>Beauveria bassiana</i> a partir de un cultivo puro.</p> <p>-Elaboración de la suspensión madre del hongo <i>Beauveria bassiana</i>.</p> <p>-Elaboración de suspensiones a diferentes concentraciones a partir de la suspensión madre.</p> <p>-Conteo de conidios para las concentraciones.</p> <p>-Aplicación del hongo <i>Beauveria bassiana</i> de las diferentes concentraciones en cada unidad experimental.</p>	<p>entomopatógeno.</p> <p>-Suspensión madre del hongo <i>Beauveria bassiana</i>.</p> <p>-Concentraciones de conidios del <i>Beauveria bassiana</i>, 10^8, 10^9, 10^{10}.</p> <p>-Conteo de conidios aplicando la fórmula: $UFC = \bar{x} * 10000 * FD$</p> <p>-Unidades experimentales rociadas con el hongo entomopatógeno con las diferentes concentraciones.</p>	
<p>OBJETIVO 2</p> <p>Identificar el mejor sustrato (esterilizado – no esterilizado), en el</p>	<p>-Pesar la misma cantidad de sustrato en una balanza analítica.</p> <p>-Esterilizar el sustrato en el Autoclave de laboratorio.</p>	<p>-1.5 kg de sustrato en cada unidad experimental.</p> <p>-Sustrato estéril.</p> <p>-Sustrato distinguido</p>	<p>Fotografías</p>

comportamiento de <i>Beauveria bassiana</i> .	-Etiquetar al sustrato estéril y no estéril en cada unidad experimental.	entre estéril y no estéril en las unidades experimentales.	
<p>OBJETIVO 3</p> <p>Establecer la mortalidad de Gallina ciega (<i>Phyllophaga spp.</i>) por la acción de <i>Beauveria bassiana</i>.</p>	<p>-Cuento de larvas muertos después de la aplicación.</p> <p>-Registro de número de días a la muerte de las larvas.</p> <p>-Cuento de insectos muertos basado en el 3^{er} postulado de Koch donde menciona que si una bacteria u hongo es inoculado en otro individuo el hongo debe reproducirse.</p>	<p>-Porcentaje de mortalidad utilizando la fórmula:</p> $\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Total de larvas muertas}}{\text{Población inicial}} * 100$ <p>-La concentración para controlar (<i>Phyllophaga spp.</i>) en relación al número de días a la muerte.</p> <p>-La mejor concentración de <i>Beauveria bassiana</i> es 10^{10} aplicado</p>	<p>-Fotografías</p> <p>-Libro de campo</p> <p>-Gráfico de tablas estadísticas</p> <p>-Datos en Excel</p>

CAPITULO II

8. FUNDAMENTACIÒN TEÒRICA

8.1 Antecedentes de investigación

Ayodeji, et al., (2020), *Beauveria bassiana*, identificada como un hongo entomatógeno, también podemos encontrar en el medio como endófito. El ciclo de vida de una variedad de cepas de *B. bassiana* se produce y se adapta como patógenos a sus huéspedes invertebrados, en cambio como endófitos podemos decir que mantienen una relación simbiótica con sus huéspedes vegetales.

Ayodeji, et al., (2020), para que las funciones ya mencionadas se cumplan, este hongo secreta una variedad de enzimas y metabolitos secundarios las cuales todas tienen una función importante, las quitinasas, lipasas y proteasas se denominan las más importantes de las enzimas producidas por *B. bassiana*. Pero otras investigaciones han descubierto que producen otras enzimas como amilasa, asparaginasa, celulasa, galactosidasa, etc. Las investigaciones anteriores han puesto más énfasis en la entomopatogenicidad, su endófitismo y su muy aclamada aplicación en el control biológico de plagas.

Barajas, et al., (2009), en los siete medios estudiados, *Beauveria bassiana* mostró crecimiento de colonias circulares en forma de micelio blanco algodonoso y un ligero halo cristalino en las zonas de crecimiento. En AHM, las colonias mostraron un crecimiento plano; mientras que en los demás medios de cultivo presentaron elevaciones marcadas. Es posible reproducir artificialmente los hongos Fito patógenos, para usarse como agente de control biológico en lugar de aplicar pesticidas.

Góngora B., et al, (2013), los primeros microorganismos se evidenciaron como agentes causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, denominados como hongos entomopatógenos, ya que se podía observar el crecimiento sobre el cuerpo de estos. En estos hongos una de las características es que no es necesario que los insectos lo ingieran para causar la enfermedad, sino que pueden atravesar su cutícula. El crecimiento de este hongo está limitado por las condiciones medioambientales adversas; como son las radiaciones solares, deficiencia de humedad y altas temperaturas, la reproducción de los hongos son denominados esporas o conidios que son las que infectan a los insectos. El proceso de control biológico está dividido en tres etapas: 1. Incorporación de las esporas a la cutícula del insecto

y germinación. 2. Penetración de la cutícula del insecto. 3. Crecimiento del hongo en el interior del insecto causando la muerte de este.

8.2 Gallina Ciega (*Phyllophaga* spp.)

El orden de los coleópteros es un grupo de insectos que se ha estudiado continuamente en todo el mundo, la larva de *Phyllophaga* se les conoce con diferentes nombres comunes como: gallina ciega, ronrón, chicharra, jobote, etc. El ciclo de vida de la gallina ciega consta de 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto. También presentar dos tipos de ciclo de vida anual y bianual, las especies anuales prefieren alturas mayores a 1500 mm/año; su alimentación consta de las raíces de las plantas, afectando a la planta en la época postrera desde julio hasta noviembre, (García M. d., 2004).

La gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) es una plaga que causa daños considerables a una gran variedad de cultivos y en muchos casos grandes pérdidas en los cultivos, las larvas bien desarrolladas se distribuyen por todo el sistema radicular de la planta. Para su control generalmente depende de productos químicos, ante esta situación es necesario llevar a cabo un buen manejo integrado donde se logre eliminar o disminuir el daño por debajo de umbral económico, (INTAGRI S. , 2015).

Morocho, et al., (2020), debido al hábito subterráneo de *Phyllophaga* presenta en su desarrollo larval, esta propenso a sufrir daños o infecciones por microorganismos, siendo esta una opción para su control. Entre los microorganismos están los hongos entomopatógenos que tiene la capacidad de parasitar a los artrópodos y se encuentran en lugares muy variados, entre esta especie muy reconocida encontramos como bioinsecticidas a *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, que han demostrado buenos resultados como plaguicidas en el control de larvas y adultos en el género *Phyllophaga*.

Morocho, et al., (2020), las especies de *Phyllophaga* encontrados están en los 2.525 m.s.n.m, es una altitud que se encuentra dentro del rango para el hábitat de su género, ya que tiene una gran capacidad de adaptación que les permite vivir desde el nivel del mar hasta los 3 500 m de altitud. Estas plagas podemos encontrar a una profundidad de 15 a 25 cm en el suelo.

Figura 1. (*Phyllophaga spp.*) en estado de larva



8.3 Taxonomía de *Phyllophaga spp.*

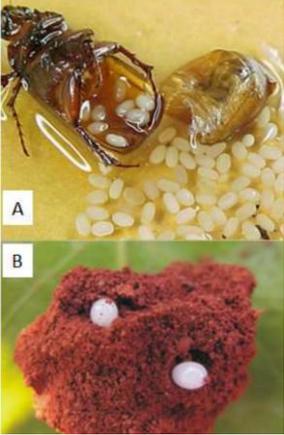
Tabla 2. Taxonomía de *Phyllophaga spp.*

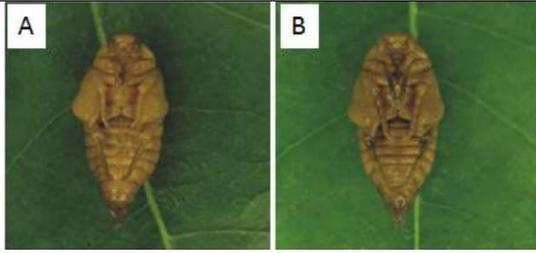
Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Clase	Insecta
Orden	Coleóptera
Familia	Scarabaeidae
Género	<i>Phyllophaga</i>
Especie	<i>Phyllophaga spp.</i>

(Altamirano, 2016)

8.4 Ciclo de vida de *Phyllophaga* spp.

Tabla 3. Ciclo de vida de *Phyllophaga* spp.

Características de crecimiento	Descripción
<p>Huevo</p> 	<p>Los huevos de color blanco y de conformación ovoide, mide entre 2 mm y 1 mm de ancho después de 24 horas de 2.5 mm de longitud y 1.25 mm de ancho, se encuentra en el suelo a una profundidad de 5 a 15 cm y en grupos de 10 a 20 que la hembra pone de 2 a 4 días, después la hembra tiene que aparear una vez más.</p>
<p>Larva</p> 	<p>Las larvas son del tipo escarabaeiforme de tipo C, con cuerpo robusto y tres pares de patas bien desarrolladas, se identifican por presentar la gálea y la lacinia maxilar completamente fusionada entre sí, las mandíbulas son fuertes y se proyectan hacia abajo, palpos maxilares y antenas formadas por 4 artejos, en las antenas el último artejo es conspicuo y provisto con áreas sensoriales amplias.</p>
<p>Pupa</p>	<p>Una vez alimentadas las larvas del tercer instar, expulsan su contenido intestinal y se crea una celda en el suelo, en donde pasan una etapa de descanso preclisálida</p>



(diapausa) entre 5 y 6 meses, antes de transformarse en pupa o crisálida, de algo más de un mes aparecen los adultos, que permanecen inactivos en las celdas hasta que la lluvia que moja la tierra los estimula a salir de la superficie

Adulto



Los adultos de *Phyllophaga* son escarabajos de forma ovalada, alargada, que miden de 15 a 18 mm de longitud; son de color café rojizo a café oscuro, antenas de tipo lamelado, los últimos tres segmentos aplanados y alargados hacia un lado. Las patas moderadamente largas, con pocas espinas o sin ellas, se caracterizan por poseer todas sus uñas tarsales de la misma forma, bífidas. Dorso en ocasiones con setas largas, pigidio masculino ovalado o casi triangular.

Fuente: (Catovich, 2012)

8.5 Daños provocados por *Phyllophaga spp.*

Los mayores daños son provocados por larvas de tercer estadio, que se alimentan de las raíces de los cultivos, con síntomas muy característicos en plantas jóvenes y plántulas, el ataque de la gallina ciega causa marchitez que se caracteriza por un primer engarce de las hojas, seguido por la muerte de las plantas pequeñas y la reducción del vigor de las más grandes. En los tubérculos y otros cultivos subterráneos, se alimentan haciendo agujeros circulares en ellas, con lo que pierden su valor comercial, causando así pérdidas económicas significativas, (Catovich, 2012).

8.6 Métodos de control

8.6.1 Control Químico

Una de las estrategias preventivas es el tratamiento de semillas con productos insecticidas, especialmente en zonas con altos niveles de plagas. Esta acción también previene el ataque de otras plagas, por lo que es una medida preventiva casi obligatoria en los cultivos. Esta protección de semillas dura alrededor de 15 a 20 días. El efecto de esta medida se completará con la aplicación de insecticidas granulados al suelo. Los insecticidas utilizados en México para el control de estas plagas son: carbofurano, terbufos, teflutrina, clorpirifos e imidacloprid. Los insecticidas granulares se rocían en un lado de la semilla durante la siembra. Además, el riego ayuda a que los insecticidas granulares lleguen a las profundidades donde aparecen las larvas. Por otro lado, el imidacloprid es muy soluble, lo que permite su uso a través del sistema de riego, (INTAGRI S. , 2015).

8.6.2 Control Biológico

Se trata del uso de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*), bacterias como *Bacillus popilliae* y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* para el control de las larvas de los nopales, especialmente las larvas de primer estadio. Los entomopatógenos infectan a la larva por contacto, ingresan al insecto para alimentarse y reproducirse, y posteriormente causan la muerte de la larva. El nivel de control con estos microorganismos depende principalmente de las condiciones ambientales en las que se desarrollan y de las especies a las que atacan. Su aplicación debe ser parte de un régimen de aplicación que permita la protección de cultivos a largo plazo. Antes de poder utilizar productos comerciales de estos entomopatógenos, se deben realizar ensayos de campo para analizar su infectividad en la plaga, (INTAGRI, 2009).

8.6.3 Control Cultural

El barbecho y revolver el suelo permite que las larvas de gallina ciega queden expuestas a la luz solar o a los depredadores, principalmente las aves. Se recomienda realizar estos experimentos inmediatamente después de la cosecha o en otoño, porque es el momento en que las larvas aparecen en la superficie del suelo. Por otra parte, enriquecer el suelo con materia orgánica permite una mayor diversidad biológica de microorganismos en los que crecen los

depredadores de estas plagas. Otra opción es utilizar cebos ligeros para atrapar adultos. Esto debe hacerse a finales de abril y en mayo. Es una técnica muy sencilla, solo requiere que coloques luces en puntos estratégicos y las enciendas en la noche entre las 8 y las 10 de la noche, (INTAGRI S. , 2015).

8.7 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se consideran enemigos por naturaleza de los insectos, pueden llegar a exterminar grandes poblaciones de plagas sin causar algún daño a la salud humana y el medio ambiente. Se les denomina hongos del género *Beauveria* que son muy eficientes para el control de varios insectos por su alta patogenicidad al traspasar en el hemocele de su hospedero y causarle la muerte tras producir toxinas. Las esporas del hongo inician su contacto con la superficie quitinosa del insecto, es cuando inicia el mecanismo entomopatógeno de adhesión, germinación y penetración por medio de enzimas proteasas, quitinasas y dentro del huésped contrarresta los mecanismos inmunes del insecto produciendo efectos nocivos y continuamente la muerte, (Puentes & Quintana, 2021).

8.8 *Beauveria Bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógenos que en la actualidad es utilizada como insecticida biológico por su eficacia contra plagas de amplia variedad y de gran importancia, como; cítricos, hortalizas y frutales. Algunos de los insectos que puede combatir son: trips, mosca blanca, pulgones, ácaros, etc.

Beauveria bassiana corresponde a un hongo entomopatógeno que cuenta con la capacidad de producir metabolitos secundarios, generalmente son depsipéptidos cíclicos complejos de bajo peso molecular como: *beauvericina*, *beauverólidos* y *basianólido*, que tienen actividades antibacterianas, anti fúngicas, citotóxicos e insecticidas, poseen baja toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo, (Chávez, et al., 2014).

En la producción del hongo se pudo observar que gracias a las medidas de higiene exigidas para ingresar al laboratorio, se logró disminuir la contaminación del medio y con esto demostrar que en el instituto también puede producir hongo *Beauveria bassiana*. La cual se puede lograr a bajo costo y se puede reducir el uso de insecticidas, que favorecería el aspecto económico de los productores en sus cultivos al adquirirlo a bajo costo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya. Con respecto al efecto del hongo *Beauveria bassiana* en la

Hypsyphyla grandella es muy efectivo en la etapa de laboratorio en la cual se tienen condiciones controladas, (Quintana, 2014).

Figura 2. *Beauveria bassiana* en el control biológico de Insectos



8.9 Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Tabla 4. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Reino	Fungi
División	<i>Amastigomycotina</i>
Subdivisión	<i>Deuteromycotina</i>
Clase	<i>Hyphomycete</i>
Orden	<i>Moniliales</i>
Familia	<i>Moniliaceae</i>
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>Beauveria bassiana</i>

8.10 Modo de acción de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo capaz de infectar a más de 200 especies de insectos, es de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso, el ciclo de vida de este hongo es de: la patogénica y la saprofitica. El crecimiento del hongo está dividido en ocho etapas: (INTAGRI, 2009)

- **Adhesión.** El primer encuentro del insecto y el hongo entomopatógeno ocurre cuando la espora (conidio) es depositada en la superficie del insecto.
- **Germinación.** La espora inicia el desarrollo del tubo germinativo, es un órgano sujetador llamado apresorio y esto le permite fijarse en el insecto, para una adecuada germinación requiere una humedad relativa del 92% y una temperatura entre 23 a 25°C.
- **Penetración.** El hongo ingresa por las partes blandas del insecto, gracias a la fijación de mecanismos físicos (presión sobre la superficie) y químicos (acción de enzimas: proteasas, lipasas y quitinasas).
- **Producción de toxinas:** dentro del insecto el hongo coloniza y ramifica en las cavidades del insecto, ahí es cuando produce una toxina denominada *Beauvericina* que ayuda a romper el sistema inmunológico del patógeno, produciendo también toxinas de *beauvericin*, *beauverilides*, *bassianolide*, *isarolides*, ácido oxálico y los pigmentos *bassianina* y *tenellina* que han demostrado poca actividad insecticida.
- **Muerte del insecto.** La muerte del insecto da como fin la fase parasitaria.
- **Multiplicación y crecimiento.** Después de la muerte del insecto viene a multiplicarse las hifas, provocando la muerte de los insectos. Después de la invasión el desarrollo del hongo sobre el insecto depende de la humedad relativa, (INTAGRI, 2009).

8.11 Morfología de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Deuteromycetes, por lo cual es considerado una de los hongos más importantes ya que se encuentran parasitando a una gran variedad de insectos. Los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, expresan una cubierta muy densa de color blanca formada por micelio y esporulación del hongo, (Guedez, 2014).

La *Beauveria bassiana* crece como un moho blanco en medios de cultivo, producen una gran cantidad de conidios polvorientos en muchas bolas de esporas. Cada espora está compuesta por células conidiógenas, estas células son cortas y ovoides, tienen una angosta extensión apical llamada raquis. El raquis se alarga después que se produce cada conidio dando como resultado una gran extensión larga en zigzag, los conidios son inucelulares, haploides e hidrófobos, (Thomas, 2012).

8.12 Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son derivados de materiales naturales como plantas, animales, minerales y microorganismos, son específicamente para plagas y su objetivo general es no representar ningún riesgo para las personas y el medio ambiente, (Pérez N. G., 2012).

Los bioplaguicidas son eficientes en el control de plagas agrícolas sin ocasionar daños severos al ambiente, la investigación y el desarrollo de su aplicación en el campo se enfoca en disminuir la contaminación ambiental ocasionada por residuos de plaguicidas químicas. Esto se va reemplazar poco a poco la cantidad de plaguicidas químicos debido al desarrollo de nuevos bioplaguicidas que estimula la actualización en la agricultura, (Pérez N. G., 2012).

Los bioplaguicidas se dividen en dos grandes grupos:

- Agentes o plaguicidas microbianos, hongos, virus, protozoos que incluyen bacterias.
- Bioquímicos que comprenden los atrayentes, reguladores de crecimiento de plantas, hormonas, insectos, enzimas y sustancias de señalización química que es muy importante en la relación planta insecto.

Se indica un uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos y representa graves problemas para la agricultura, medio ambiente y la salud humana. En el control biológico de plagas representan aspectos generales de los bioplaguicidas, estos productos se pueden usar con seguridad una agricultura sustentable. Para asegurar un buen mercado los patógenos que se utilizan en la formulación de un plaguicida microbiano debe ser efectivos y tener una alta patogenicidad contra una o varias plagas de cultivo de importancia económica y social, (Pérez N. G., 2012).

8.13 Medios de cultivo

Los medios de cultivo de microorganismos (hongos, bacterias, levaduras) son esenciales en el Laboratorio, por lo que cada día se prepara y se utiliza. Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos, (Mondino, 2009).

8.14 Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara adaptada al microscopio de campo claro. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo se ha marcado un diamante con una cuadrícula, se trata de un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. En cada cuadro de la parte medio central se cuentan todos los conidios que se encuentran dentro y además los conidios que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda del cuadrado, no se cuentan los conidios que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha, (Ramírez H. G., 2014).

CAPITULO III

9 HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* si controla a la Gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en condiciones de laboratorio.

Hipótesis Alternativa

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* no controla a la Gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en condiciones de laboratorio.

10 METODOLOGÍA

10.1 Ubicación del ensayo

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Campus Salache, de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en el período Abril – Octubre 2022.

Figura 3. Ubicación del Campus Salache

Fuente: Adaptado de (Google maps)

Tabla 5. Ubicación geográfica de la Investigación

Provincia	Cotopaxi
Cantón	Latacunga
Parroquia	Eloy Alfaro
Barrio	Salache
Altitud	1922,5803
Latitud	0°59'50,2"S
Longitud	78°37'18,071"W

10.2 Tipo de investigación

10.2.1 Experimental

La investigación experimental consiste en el empleo de una o más variables experimentales no comprobados en condiciones controladas, con el fin de describir de qué modo o la causa de una situación en particular. El experimento planteado por el investigador, permite proponer determinadas variables de estudio manipulados por el mismo, para controlar el incremento o disminución de dichas variables y su resultado. (Grajales, 2000). Por medio de esta investigación se realizó la recopilación de los datos de *Beauveria Bassiana* multiplicado a partir de un cultivo puro de laboratorio para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de Laboratorio Campus Salache, en el periodo Abril – Agosto 2022, con el fin de comparar las mediciones de un grupo experimental.

10.2.2 Cuantitativa

La investigación cuantitativa es en la que se recogen y analizan datos cuantitativos sobre las variables planteadas. Evita la cuantificación. La investigación cuantitativa busca en determinar la fuerza de relación o correlación entre variables, (Díaz, 2002). Por medio de esta investigación se buscó la conexión entre los elementos que han sido cuantificados permitiendo la interpretación de los resultados.

10.3 Modalidad básica de investigación

10.3.1 De laboratorio

La investigación se dio totalmente en el laboratorio debido que ahí fue el lugar donde se planteó el experimento y continuamente la recolección de los datos.

10.3.2 Bibliográfico

Esta clase de investigación es un procedimiento científico, que consiste en investigar, analizar e interpretar la información de un tema, que permite la construcción de conocimientos, la revisión bibliográfica debe partir de que es lo que se busca y plantear bien las palabras del tema, (Vilanova, 2012). Estudio en la cual el material bibliográfico y documental tiene relación que servirá de base para el texto del marco teórico y los resultados.

10.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

10.4.1 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de la investigación se continuó la tabulación de datos y análisis estadístico en el programa de InfoStat.

10.4.2 Registro de datos

Se llevó un libro de campo para apuntar todos los datos de la investigación.

10.5 Materiales

10.5.1 Materia Prima

- Turba 40 lb.
- Tierra 1 qq.

- Larvas (*Phyllophaga* spp.) de tercer estadio.

10.5.2 Reactivos

- 1 Agar Papa Dextrosa (PDA) de 500 gr.
- 4 Antibiótico (Genta Max 280 mg)

10.5.3 Materiales de Laboratorio

- 1 Estuche de disección
- 2 Vasos de precipitación de 400 ml
- 200 Cajas Petri de vidrio y plásticos
- 3 Probetas de 100 ml
- 1 Para film

10.5.4 Materiales para la Investigación

- 28 Botellas de 5 litros
- 1 Roseador grande

10.6 Equipos

- Microscopio
- Estereoscopio
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Vórtex
- Balanza analítica
- Cámara de Neubauer

10.7 Diseño Experimental

- Se realizó un arreglo factorial de $2 \times 3 + 1$ adicional implementado en un DBCA con cuatro repeticiones, donde se presentó a Factor A como concentración de conidios (10^8 , 10^9 , 10^{10}) y el factor B corresponde a estado de la turba (estéril, no estéril), formado por seis tratamientos y un adicional, siendo un total de 28 unidades experimentales (UE), se aplicó pruebas de Tukey al 5%; con análisis estadístico se determinó el factor A (concentración de conidios) en función de la variable porcentaje de mortalidad.

10.7.1 Unidad experimental

En cada unidad experimental se mantuvo 10 larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) con 1.5 kg de turba en las botellas plásticas de 5 litros.

10.7.2 Factor en estudio

A: Concentración de conidios

- A1 = 10^8
- A2 = 10^9
- A3 = 10^{10}

B: Sustrato estéril y no estéril

- B1 = Estéril
- B2 = No estéril

10.7.3 Tratamiento en estudio

Tabla 6. Tratamientos, código, descripción

Tratamientos	Código	Descripción
T1	a1b1	10^8 Conidios ml-L/ A. estéril
T2	a1b2	10^8 Conidios ml-L/ A. no estéril
T3	a2b1	10^9 Conidios ml-L/ A. estéril
T4	a2b2	10^9 Conidios ml-L/ A. no estéril
T5	a3b1	10^{10} Conidios ml-L/ A. estéril
T6	a3b2	10^{10} Conidios ml-L/ A. no estéril
T7	a0b0	Adicional

10.7.4 Distribución del ensayo

Tabla 7. Distribución del ensayo

RI	RII	RIII	RIV
T1 (a1b1)	T2 (a1b2)	T3 (a2b1)	T4 (a2b2)
T2 (a1b2)	T3 (a2b1)	T4 (a2b2)	T5 (a3b1)
T3 (a2b1)	T4 (a2b2)	T5 (a3b1)	T6 (a3b2)
T4 (a2b2)	T5 (a3b1)	T6 (a3b2)	T7 (a0b0)
T5 (a3b1)	T6 (a3b2)	T7 (a0b0)	T1 (a1b1)
T6 (a3b2)	T7 (a0b0)	T1 (a1b1)	T2 (a1b2)
T7 (a0b0)	T1 (a1b1)	T2 (a1b2)	T3 (a2b1)

10.7.5 ADEVA

Tabla 8. Esquema del Adeva

Factor de Variación (FV)	Grados de libertad (GL)
Repeticiones	3
Tratamiento	6
FACTOR A	2
FACTOR B	1
FACTOR A * FACTOR B	2
Factorial vs Adicional	1
ERROR	18
Total	27

10.8 Variables a evaluar

El siguiente cuadro presenta las variables a evaluar:

Tabla 9. Variable a evaluar

Tipo de Variable	Nombre	Indicador	Índice	Técnica	Instrumentos
Dependiente	Mortalidad	Número de larvas muertas de <i>Phyllophaga spp.</i>	Porcentaje de mortalidad	Conteo	Observación directa
Independiente	<i>Beauveria Bassiana</i>	Número de conidios / ml	Concentración de conidios 10^8 , 10^9 , 10^{10}	Fórmula	Cámara de Neubauer

10.9 Metodología de multiplicación

10.9.1 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó la metodología empleada por (Ramírez H. G., 2014), para la preparación del medio de cultivo PDA, se realizó en los siguientes pasos:

- En una baso de precipitación esterilizada se midió 400ml de agua destilada
- Se pesó 15,6 gr de agar nutritivo solido en una balanza analítica, se procedió a verter en los 400 ml de agua dando una disolución que abastece para 20 cajas Petri, actividad que se ejecutó 2 veces por semana durante un mes y medio.
- Se agitó la botella de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea, terminado este proceso se llevó a la autoclave para ser esterilizado a 35 °C por 35 minutos.
- Al terminar el tiempo de esterilización se agregó el antibiótico, que consistió en la aplicación de una ampolla de Genta Max de 280, para evitar la contaminación de bacterias en el medio de cultivo proceso que se realizó en la cámara laminar tras 15 min de enfriamiento de la disolución; disolución que fue repartido en cajas Petri de plástico y se dejó en reposo aproximadamente 10 minutos para que se solidifique.

10.9.2 Incubación

- Para la incubación se utilizó una incubadora, se mantuvo la temperatura del medio de cultivo entre 25 y 37°C por 8 días. Tras la incubación en condiciones adecuadas, cada célula viable originó una colonia visible resultado de sucesivas divisiones celulares.

10.9.3 Morfología

Micelio: De color blanco, algodonosas y polvorientas.

Conidios y conidióforos

Conidios: De contraste hialinos, redondeados, subglobosas unicelulares con base apiculada de 2,5 – 4,5 μm .

Conidióforos: Células Conidióforos alargadas, solitarias, su base subglobosa de 3 a 20 μm de largo por 1.3 a 4 μm de ancho, formado racimos compactados.

10.10 Preparación de solución madre

10.10.1 Esterilización

Se introdujo a autoclave pinzas, tijeras, punta de micropipetas, vasos, asa, probetas y agua destiladas todo envuelto en papel aluminio.

10.10.2 Cosecha de micelios

- Se extrajo las cajas Petri con presencia de micelios y con un asa bacteriológica se procedió a dar un raspado para desprender todas las esporas del medio de cultivo, esta suspensión se llenó en 300 ml de agua destilada purificada hasta tener una concentración aproximada a 10^8 conidios/ml.
- Se agito durante 10 minutos la solución para que se desprendan las partículas.

10.10.3 Preparación de concentraciones

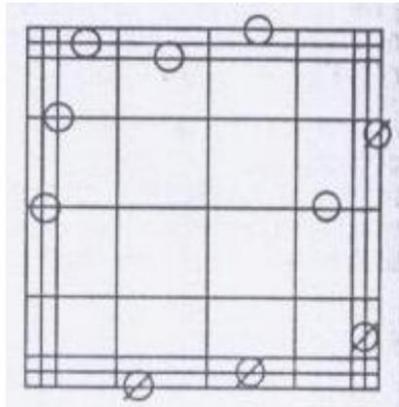
- En un tubo de ensayo se dispense 10 ml de la solución madre previamente para agitar durante 50 segundos.
- Se tomó 1 ml con una micropipeta de la solución madre y se colocó en el primer tubo de ensayo que contaba con 9 ml de agua purificada así aforando a 10 ml, previo a aquello se agito en el vórtex de igual manera durante 50 segundos.

- Este método se replicó sucesivamente en todos los tubos de ensayo hasta llegar a la primera concentración 10^8 conidios/ml segunda concentración 10^9 conidios/ml y finalmente la tercera concentración 10^{10} conidios/ml.

10.10.4 Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en la cámara de Neubauer)

- Con una micropipeta de $20 \mu\text{m}$ se extrajo de la última muestra de las soluciones seriadas, se transfirió $60 \mu\text{m}$ a la cámara de Neubauer hasta que por capilaridad se llene un lado de la cámara. Se llevó la cámara al microscopio y se observó con el lente $10\times$, para esta actividad se ubicó el lente en el primer cuadrante (superior izquierdo), se cuantificó las esporas presentes en el cuadrante central como indica la figura.

Figura 4. Cámara de Neubauer



Fuente: (Ramírez H. G., 2014)

El resultado se obtuvo con la aplicación de la siguiente fórmula escrita por Ramírez, et al, (2014).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Total de larvas muertas}}{\text{Cuadrantes contabilizados}} * \frac{10000}{\text{Número de subcuadrantes contabilizados}}$$

10.11 Colecta de larvas (*Phyllophaga spp.*)

Se recolectaron larvas especialmente del tercer estadio de (*Phyllophaga spp.*) en los cual se depositaron en recipientes plásticos mismos que contienen una cantidad de turba y tierra como alimentación para luego ser trasladados al laboratorio del campus Salache.

10.12 Implementación del ensayo

Las larvas recolectadas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y luego se les enjuagó con agua destilada estéril y secarlas en papel absorbente. Se escogieron 280 larvas de tercer estadio y se colocaron en 14 recipientes plásticos estériles y 14 recipientes no estériles mismos que llegaron a contener 10 larvas de (*Phyllophaga spp.*) cada uno a una profundidad de 15 - 20 cm.

10.12.1 Exposición del hongo en las larvas

La inoculación del hongo en las larvas se dio en todos los tratamientos en una cantidad de 12.5 ml del hongo en estado líquido con un roseador en cada uno de la unidad experimental, a excepción de los adicionales.

10.12.2 Evaluación del ensayo

La aplicación de las concentraciones de conidios se ejecutó cada 5 días, registrándose datos de mortalidad de las larvas cada 3 días durante 37 días. Para esta actividad se contabilizó las larvas muertas después de la inoculación de *Beauveria bassiana*.

Para calcular el porcentaje de mortalidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Total de larvas muertas}}{\text{Población inicial}} * 100$$

10.12.3 Identificación de los insectos muertos

Las larvas muertas se colocaron en la incubadora con medio de cultivo hasta la emergencia del hongo que fue a los 3 días.

Figura 5. *Esporulación de Beauveria bassiana en gallina ciega*



CAPITULO IV

11 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de mortalidad para gallina ciega (*Phyllophaga spp.*)

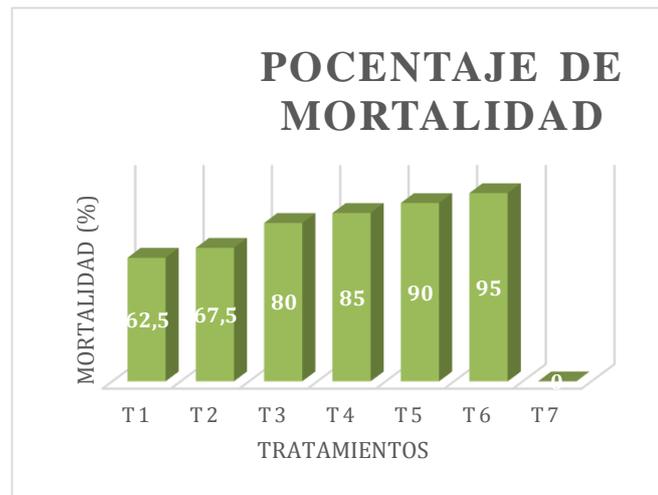
Tabla 10. Adeva del porcentaje de mortalidad

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Repeticiones	28,57	3	9,52	0,15	0,9265	N.S
Tratamientos	25192,86	6	4198,81	67,39	<0,0001	**
FACTOR A						
(Concentraciones)	3100	2	1550	24,26	<0,0001	**
FACTOR B (Sustrato)	150	1	150	2,35	0,1428	N.S
FACTOR A*B						
(Concentraciones)	0	2	0	0	>0,9999	N.S
Arreglo F. vs Adicional	21942,86	1	21942,86	352,2	<0,0001	**
Error	1121,43	18	62,3			
Total	26342,86	27				
CV %					11,51	

En la tabla 11 del ADEVA encontramos que los factores planeados durante los 37 días de investigación dieron los resultados esperados, donde los tratamientos con respecto al adicional demostró un resultado altamente significativo, el Factor A (Concentraciones) nos da un resultado altamente significativo, a diferencia del factor B (Sustrato esterilizado, sustrato sin esterilizar), no es altamente significativo, es decir que el Factor B no tiene relevancia en esta investigación y depende del Factor A (concentraciones). Con respecto a las interacciones del Factor A y el Factor B no existe significancia, obteniendo así un Coeficiente de Variación (CV) de 11,51. El resultado coincide con lo indicado por: Elmer Castro (2021) El análisis de varianza identificó que existe diferencia significativa para tratamientos al 5% y determina que no existe diferencias significativas para bloques o repeticiones.

Tabla 11. Contrastes Ortogonales Adicional vs Tratamiento

Tratamientos	Medias	Rango		
6	95	A		
5	90	A		
4	85	A	B	
3	80	A	B	C
2	67,5		B	C
1	62,5			C
7	0			D

Gráfico 1. Porcentaje de mortalidad del adicional vs tratamiento

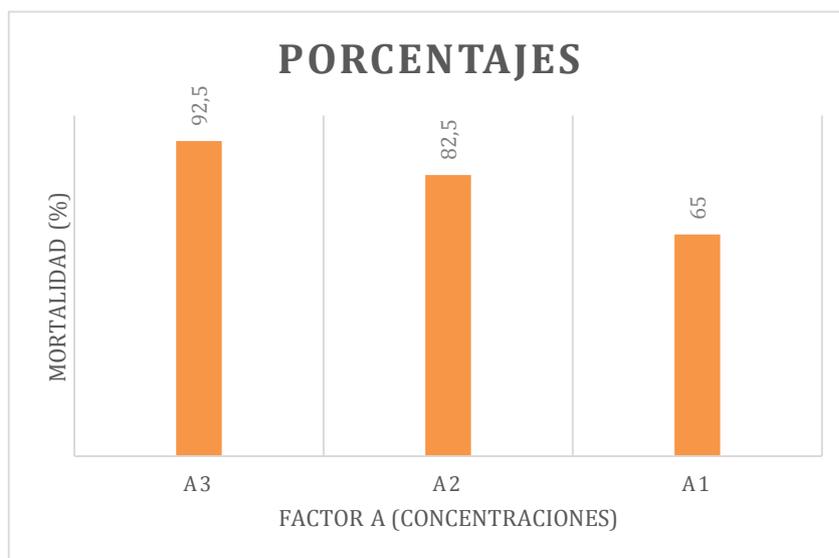
La comparación o contraste ortogonal del tratamiento vs testigo (T1, T2, T3, T4, T5, T6 vs T7) dio altamente significativo, determinando rangos homogéneos (A) en el tratamiento 5 y 6 que corresponde a un mayor porcentaje de mortalidad, con medias de 90% y 95%, y el rango D que corresponde al T7 (adicional) con porcentaje de mortalidad de 0%, que se lo puede explicar que en los tratamientos hubo un correcto control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) a diferencia del testigo donde no se aplicó ninguna concentración de *Beauveria bassiana*. Según Elmer Castro (2021) en el contraste Testigo vs Tratamientos, se

determinó 2 rangos homogéneos. T1 y T3 alcanzaron un promedio general de 81 y 79 % de emergencia respectivamente. Se puede considerar como la mejor respuesta en porcentaje de emergencia T2 y T0 ocuparon el último rango con un porcentaje de emergencia del 75 %.

Tabla 12. Pruebas de Tukey para el Factor A

FACTOR A (Concentraciones)	Medias	Rango
C10(10)	92,5	A
C10(9)	82,5	A
C10(8)	65	B

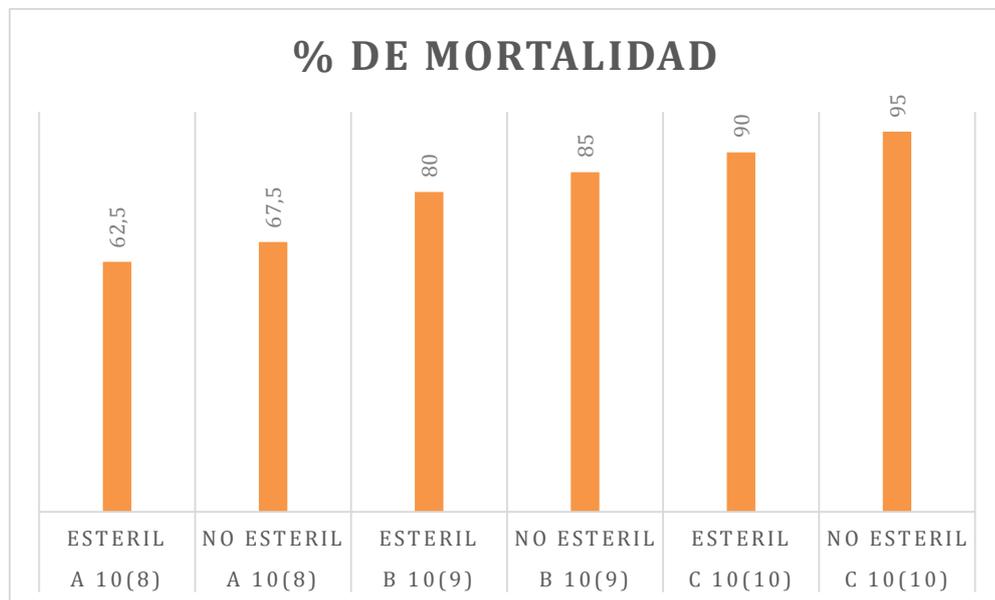
Gráfico 2. Pruebas de Tukey con el Factor A (Concentraciones de conidios)



El factor A (concentraciones) está en dos rangos, rango A donde se encuentra el mayor porcentaje de mortalidad donde está la concentración 10^9 con 82.5 %, 10^{10} con 92,5% y en el rango B esta la concentración 10^8 con 65%. Que coincide con lo mencionado por Elmer Castro (2021) en la prueba de Tukey, se determinó 2 rangos. T3 y T1 alcanzaron un promedio general de 49 días a la floración respectivamente al ocupar el primer rango sin compartir. Se puede considerar como la mejor respuesta en cuanto altura de planta. T1 con promedio de 48 días ocupó el segundo rango en días a la floración. T0 ocupó el último rango de 46 días.

Tabla 13. Pruebas de Tukey al 5% para los Factores A*B

FACTOR A (Concentraciones)	FACTOR B (Sustrato)	Medias	Rangos		
3	2	95	A		
3	1	90	A		
2	2	85	A	B	
2	1	80	A	B	C
1	2	67,5		B	C
1	1	62,5			C

Gráfico 3. Pruebas de Tukey al 5% de A*B

En la tabla 15 encontramos los rangos en la cual se encuentra los factores A y B, que presenta los siguientes datos: la concentración 10^8 en sustrato estéril en la categoría C con un porcentaje de 62,5 % y con turba no estéril 67.5 %. La concentración 10^9 está en la categoría

B, en sustrato estéril presentó un porcentaje de 80 % y en sustrato no estéril un porcentaje de 85%. La concentración 10^{10} está en la categoría A obteniendo un empate técnico, en sustrato estéril presentó un porcentaje de 90% y en sustrato no estéril un porcentaje de 96%. Obteniendo así que la tercera concentración 10^{10} en el sustrato no esterilizado se obtuvo el mejor resultado en porcentaje de mortalidad en un periodo de 37 días.

CAPITULO V

12 CONCLUSIONES

- La mejor concentración es 10^{10} conidios/ml en el sustrato no esterilizado.
- Se identificó que no existió diferencia significativa entre los sustratos (estéril y no estéril) para el control de Gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en condiciones de laboratorio, lo que se concluye que *Beauveria bassiana* no depende del sustrato (estéril y no estéril) para el control de gallina ciega.
- Se determinó el mejor control de Gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) con un 95% de mortalidad en el tratamiento seis (Concentración 10^{10} conidios/ml en sustrato no esterilizado) en el periodo evaluado de 37 días.

13 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que todos los instrumentos y materiales estén en buen estado de esta manera prevenir complicaciones en la investigación con respecto a tiempo y gastos económicos.
- El equipo de incubación debe estar libre de otros hongos y bacterias para evitar contaminación del hongo entomopatógeno en estudio.

14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (NRF), F. N. (2020). Potencial biotecnológico de *Beauveria bassiana* como fuente de nuevos biocatalizadores y metabolitos. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2020.1805403?scroll=top&needAccess=true>
- (NRF), F. N. (2020). Potencial biotecnológico de *Beauveria bassiana* como fuente de nuevos biocatalizadores y metabolitos. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2020.1805403?scroll=top&needAccess=true>
- (NRF), F. N. (10 de Agosto de 2020). Potencial biotecnológico de *Beauveria bassiana* como fuente de nuevos biocatalizadores y metabolitos. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2020.1805403?scroll=top&needAccess=true>
- al., M. e. (31 de 12 de 2020). Presencia de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) y hongos entomopatógenos potenciales para su control biológico en sistemas agrícolas de Saraguro (Loja, Ecuador). *CEDAMAZ*. Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/896/762>
- Altamirano, M. (2016). Evaluación de insecticidas biológicos y químicos para el control de *Phyllophaga* spp. en el cultivo de repollo (*Brassica oleracea* L.) Miraflores, Esteli, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria, Managua. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/1913/1/tmh10a465.pdf>
- Antal, e. a. (1992). Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10778/951>
- Azogue, D. (Octubre de 2022).
- BARAJAS-ONTIVEROS, C. G., MORALES-ROMANO, M. D., POZO-NUÑEZ, E. M., & NÚÑEZ-LÓPEZ, M. L.-A. (25 de Abril de 2009). Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. Obtenido de <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/736/856>

- Brenes Madriz, R. A. (2020). Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga sp.*). Obtenido de Diciembre: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822020000400140&script=sci_arttext
- Catovich. (2012). *Ficha Técnica de Phyllophaga spp.* DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600893/Gallinas_ciegas.pdf
- Contreras, C. (2019). Evaluación de la percepción de los agricultores maiceros sobre los daños observados en el cultivo de maíz, ocasionados por insectos plaga en la zona de Mocache. Obtenido de <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3628/1/T-UTEQ-0164.pdf>
- Díaz, P. F. (2002). Investigación Cuantitativa y Cualitativa. Obtenido de http://www.ecominga.uqam.ca/ECOMINGA_2011/PDF/BIBLIOGRAPHIE/GUIDE_LLECTURE_2/4/2.Pita_Fernandez_y_Pertegas_Diaz.pdf
- Ejido Juan Sarabia, Q. (Diciembre de 2014). PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL HONGO Beauveria. Obtenido de http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/for/for-2014-5.pdf
- García, M. (2005). Virulecia de Beauveria bassiana y metarhizium anisopliae, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de Phyllophaga crinita bajo condiciones de laboratorio. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116169007.pdf>
- García, M. d. (2004). Evaluación de insecticidas biológicos, botánicos y químicos para el control de Phyllophaga sp, en el cultivo de repollo (Brassica oleracea L.), Miraflores, Estelí, Nicaragua. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/1913/1/tnh10a465.pdf>
- García, M. d. (2004). Evaluación de insecticidas biológicos, botánicos y químicos para el control de Phyllophaga sp, en el cultivo de repollo (Brassica oleracea L.), Miraflores, Estelí, Nicaragua. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/1913/1/tnh10a465.pdf>
- GONGORA B., C. (07 de Mayo de 2013). Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café. Obtenido de <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/346>

- Grajales, T. (2000). *Tipos de investigación*. Obtenido de <https://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1RM1F0L42-VZ46F4-319H/871.pdf>
- Guedez, c. (2014). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en trujillo, Venezuela. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/271825762_CHARACTERIZACION_MORFOLOGICA_DE_BEAUVERIA_BASSIANA_AISLADA_DE_DIFERENTES_INSECTOS_EN_TRUJILLO-_VENEZUELA#:~:text=Beauveria%20bassiana%2C%20es%20un%20hongo,de%201os%20pat%C3%B3genos%20m%C3%A1s%20importantes
- Hidalgo, (. T. (29 de Noviembre de 2021). Gallina ciega, ¿plaga o aliado? *Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)*. Obtenido de <https://idp.cimmyt.org/gallina-ciega-plaga-o-aliado/>
- INTAGRI. (2009). *Beauveria bassiana* en el Control Biológico de Patógenos. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
- INTAGRI, S. (2015). Manejo Integrado de la Gallina Ciega. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-integrado-de-la-gallina-ciega#>
- Mayhua, E. C. (2021). Efecto de la aplicación foliar del fosforo. Obtenido de <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/3845/TESIS-2021-AGRONOMIA-CASTRO%20MAYHUA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- MELO-MOLINA, E. L. (Junio de 2007). *Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans**. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882007000100004
- Mins, A. &. (1979). Clasificación taxonómica .
- Mondino, P. (24 de Abril de 2009). Preparación de medios de. Obtenido de http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/03-Medios_de_cultivos_imprimir.pdf
- Morocho, N., & Ruiz, M. M. (2020). Presencia de *Phyllophagaspp.* (Coleoptera: Scarabaeidae) y hongos entomopatógenos potenciales para su control biológico en sistemas

- agrícolasde Saraguro (Loja, Ecuador). Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/896/762>
- Pérez, N. G. (2012). Bioplaguicidas una opción para el control bilógico de plagas. Obtenido de <http://uaim.edu.mx/webraximhai/Ej-25baticulosPDF/3%20NAVA-PEREZ.pdf>
- Puentes, A. H., & Quintana, A. M. (24 de Abril de 2021). Effect of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin on the control of sheep ked (*Melophagus ovinus*). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172021000200021&script=sci_arttext
- Quintana, J. S. (Diciembre de 2014). Producción y aplicación del hongo *Beauveria*. Obtenido de http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/for/for-2014-5.pdf
- Quintana, J. S. (Diciembre de 2014). Producción y aplicación del hongo *Beauveria*. Obtenido de http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/for/for-2014-5.pdf
- Ramírez, H. G. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Servicio Nacional de Sanidad Agraria, (SANASA) SCB*. Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Usode-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>
- Rizo, J. (2015). *Técnicas de Investigación Documental* . Obtenido de <https://repositorio.unan.edu.ni/12168/1/100795.pdf>
- Shannon, P. (1996). *Biología y control de Phyllophaga spp.* Obtenido de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=8cM4jkoaJtYC&oi=fnd&pg=PP7&dq=da%C3%B1os+causados+por+la+phyllophaga+spp&ots=jZGcR4Spy5&sig=qXn4t4I1uXOOjM0vRcWpmEfMTUg#v=onepage&q=da%C3%B1os%20causados%20por%20la%20phyllophaga%20spp&f=false>
- SILVA, W. P. (06 de Febrero de 2015). *La problemática ambiental y el deterioro de los recursos naturales en el Ecuador, una respectiva desde la geografía*. Quito. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8665/LA%20PROBLEMA%2081TICA%20AMBIENTAL%20Y%20EL%20DETERIORO%20DE%20R.N.%20EN%20EL%20ECUADOR.%20UNA%20PERSPECTIVA%20DESDE%20LA%20GEOGRAFI.pdf?sequence=1>

Thomas, M. (2012). Obtenido de https://hmong.es/wiki/Beauveria_bassiana

Thomas, M. (2012). Morfología de Beauveria bassiana. Obtenido de https://hmong.es/wiki/Beauveria_bassiana

Vilanova, J. C. (2012). Revisión bibliográfica del tema de estudio de un proyecto de investigación. 108 - 114. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0033833811002189#!>

15 ANEXOS

Anexo 1. Hoja de vida del Alumno (David Azogue)



HOJA DE VIDA

1. INFORMACIÓN GENERAL

Nombres y Apellidos:	Azogue Gavilanez Wellington David
Nacionalidad:	Ecuatoriana
Fecha de Nacimiento:	Julio 05 de 1997
Lugar de Nacimiento:	Guaranda – Bolívar
Cédula de ciudadanía:	0504356007
Lugar de residencia:	Cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi
Dirección domiciliaria:	Parroquia Panzaleo, Barrio la Delicia
Estado civil:	Soltero

Teléfono domicilio: (03)2738408

Célular: 0987109170

Correo Electrónico: Wellington.azogue6007@utc.edu.ec

Ocupación: Estudiante de la Universidad Técnica de Cotopaxi (desde 2018 hasta 2022)

2. FORMACIÓN ACADÉMICA

ESTUDIOS PRIMARIOS

- Escuela José Mejía Lequerica

ESTUDIOS SECUNDARIOS

- Unidad Educativa Salcedo
(Latacunga – Ecuador)
Bachiller en Ciencias

ESTUDIOS DE TERCERNIVEL

- Universidad Técnica de Cotopaxi
(Latacunga Ecuador)

Anexo 2. Hoja de vida del Docente Tutor (Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg.)

CURRICULUM VITAE



APELLIDOS: CHANCUSIG ESPIN
NOMBRES: EDWIN MARCELO
ESTADO CIVIL: CASADO
CEDULA DE CIUDADANÍA: 0501148837
LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO: PARRQ. GUAYTACAMA, 10 FEBRE/1962
DIRECCION DOMICILIARIA: SECTOR LOMA GRANDE –SAN FELIPE
NUMEROS TELÉFONICOS: 0997391825, 032252091
E-MAIL: edwin_chancusig@hotmail.com

NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO EN EL CONESUP	CODIGO DE REGISTRO CONESUP
TERCER	INGENIERO AGRÓNOMO	12/08/2003	1010-03-441361
CUARTO	DOCTORADO EN DESARROLLO HUMANO Y SUSTENTABLE	28-03-2017	152398322
CUARTO	MAGISTER EN DESARROLLO HUMANO Y SOSTENIBLE.	12/08/2013	CL-13-5178
CUARTO	MAGISTER EN GESTIÓN EN DESARROLLO RURAL Y AGRICULTUA SUSTENTABLE	12-09-2007	CL-07-923
CUARTO	AGROECOLOGÍA Y DESARROLLO RURAL SUSTENTABLE, UNIVERSIDAD INTRNACIONAL DE ANDALUCIA-ESPAÑA (EGRESADO)	26-07-1.997	
CUARTO	DIPLOMADO EN EDUCACIÓN INTERCULTURAL Y DESARROLLO SUSTENTABLE.	02/08/2009	

Anexo 3. Hoja de vida del lector 1 (Ing. Guido Euclides Yauli Chicaiza, Mg.)



HOJA DE VIDA

1. INFORMACION PERSONAL

Nombres y Apellidos:	Yauli Chicaiza Guido Euclides
Nacionalidad:	Ecuatoriana
Fecha de nacimiento:	abril 22 de 1968
Lugar de Nacimiento:	Latacunga – Cotopaxi
Cedula de ciudadanía	0501604409
Lugar de residencia:	Cantón Pujilí, provincia de Cotopaxi
Dirección Domiciliaria:	Av. Velasco Ibarra, Km 1 vía Pujilí – Latacunga
Estado civil:	Casado con Julieta Marina Veintimilla Vaca
Teléfono domicilio:	032725264
Celular:	0992745646
Correo Electrónico:	guido.yauli@utc.edu.ec
Ocupación:	Docente Titular de la Universidad Técnica de Cotopaxi (desde 1995 hasta la presente fecha)

2. INFORMACION ACADEMICA

- **Magister en Agronomía**, mención Sistemas Agropecuarios en la Universidad Estatal Amazónica
- **Master en Educación**, mención Planeamiento de Instituciones de Educación Superior en la Universidad Técnica de Cotopaxi
- **Diplomado en Educación Superior** en la Universidad Técnica de Cotopaxi
- **Ingeniero Agrónomo** en la Universidad Técnica de Ambato

Anexo 4. Hoja de vida del lector 3 (Ing. Santiago Jiménez)



JIMENEZ JACOME CRISTIAN SANTIAGO

PERFIL PROFESIONAL

INGENIERO AGRONOMO
DESARROLLISTA DE
PROYECTOS
AGROPECUARIOS Y
SOCIOPRODUCTIVOS
DOCENTE - INVESTIGADOR
DE LA UNIVERSIDAD
TECNICA DE COTOPAXI

CONTACTO

 cristian.jimenez@utc.edu.ec

 0995659200

FORMACIÓN ACADÉMICA

ESTUDIOS PRIMARIOS

- Escuela Antonio Aristarco Jácome (Pujilí-Ecuador)
Primer Escolta del Pabellón Nacional

ESTUDIOS SECUNDARIOS

- Colegio Técnico Particular Hermano Miguel (Latacunga-Ecuador)
-Bachiller en Ciencias Físicas y Matemática
-Técnico en Topografía

ESTUDIOS DE TERCER NIVEL

- Universidad Técnica de Cotopaxi (Latacunga-Ecuador)
-Ingeniero Agrónomo
- Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte y Loynaz (Camaguey-Cuba)
-Desarrolló de proyecto de titulación de pre-grado bajo el convenio UTC- Universidad de Camaguey

ESTUDIOS DE CUARTO NIVEL

- Universidad Tecnológica Equinoccial (Quito-Ecuador)
-Diploma Superior en Investigación y Proyectos
- Universidad Técnica de Cotopaxi (Latacunga-Ecuador)
-Magister en Seguridad y Prevención de Riesgos del Trabajo
- Universidad Técnica de Cotopaxi (Latacunga-Ecuador)
-Magister en Sanidad Vegetal

ESTUDIOS EN CURSO

- Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima-Peru)
- Doctorado en Agricultura Sustentable

EXPERIENCIA

14 AÑOS DE DOCENCIA
OCTUBRE 2008- HASTA LA ACTUALIDAD

- Docente en la Carrera de Agronomía, Agroindustria, Ambiental, Ecoturismo, Veterinari.
- Ex Coordinador de Servicio Comunitario de la Carrera de Agronomía
- Miembro del grupo de investigación de Biodiversidad y Granos Andinos.

Anexo 5. Análisis Taxonómico de *Beauveria bassiana*



ANÁLISIS DE LABORATORIO PSL 292 TAXONOMIA FUNGAL A NIVEL DE GENERO Y/O ESPECIE

Fecha toma de muestra: 10.02.2022	Fecha laboratorio: 06.03.2022
Solicitado por: Ing. Valeria Bermudez	Responsable: Ing. Valeria Bermudez
Empresa: Particular	Finca: no reportada
Cultivo: no reportado	Estadio Fisiológico: no reportado
Ciclo Productivo: productivo	Variedad: no reportada
Material para análisis: Colonias microbianas	email: vbalery8@gmail.com
Orden de trabajo: 292	Factura:
Telf.: 0979110948	

RESULTADOS

Muestra 1.

UBICACION TAXONOMICA DE *Beauveria bassiana*.

Clasificación taxonómica según Alexopoulos y Mims (1979).

Reino:	Myceteae
División:	Amastigomycota
Sub división:	Deuteromycotina
Clase de forma:	Hyphomycetidae
Orden de forma:	Moniliales.
Familia de forma:	Moniliaceae.
Género:	<i>Beauveria</i> Vuillemin
Especie:	<i>Beauveria bassiana</i> . (Bals) Vuillemin

MORFOLOGIA

Colonias

De color blanco, aterciopeladas, algodonosas, pulverulentas, con superficie semielevada, con formación de sinemas, como principal característica de la especie *B. bassiana*, especialmente en plena producción de conidias. Al inicio del crecimiento de las colonias son de color blanco, posteriormente de color amarillo pálido, que evidencia la producción de metabolitos.

Conidioforos

Sencillos, irregularmente agrupados, verticilados en grupo, hinchadas en la base, acortándose en diámetro en la región que sostiene a la conidia, la cual se presenta en forma de zigzag.

Fiálides

Con una parte basal dilatada terminando en zig-zag.

Conidios

De contrastes hialinos, redondeadas o globosas o subglobosas unicelulares, con la base apiculada de 2.5-4,5 μm . El raquis de 25 μm .

Conidióforos células conidioforas alargadas, solitarias, de base subglobosa o cilíndrica de 3 a 20 μm de largo por 1.3 a 4 μm de ancho, formando racimos compactos.

GERMINACION

Las conidias germinan a las 20 horas de incubación, alcanzando el 99,90% de germinación.

METABOLITOS SECUNDARIOS

Metabolitos	Beauvericina	Bassianolides	Enniantinas A y B	Beauverolidos	Bassianinas	Tenelinas	oosporeinas	Acidos oxalicos	Oxalatos de calcio
Cepa 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Metabolitos	Acido Fusarico	Acido Dipicolinico	Paecolomicinas	Efraeptinas	Beauverolidos	Eniantinas	Ciclosporinas	Pyridovericina
Cepa 1	+	+	+	+	+	+	+	+

ENZIMAS DETECTADAS

Enzimas	Proteasas	Lipasas	Aminopeptidasas	Esterasas	Quitinasa
Cepa 1	+	+	+	+	+

Dr. Carlos Falconi Borja PhD
 BIONIKA LABS (PSL)
 0999796977-3460158
 www.bdki.eu
 drfalconi-labs@biosoftware.de

Anexo 6. Presupuesto

Objetivo 1					
Rubro General	Detalle	Tamaño	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Multiplicar Beauveria bassiana	Cajas Petri de vidrio	Grande	5	2,5	\$ 12,50
	Cajas Petri de plástico	Grande	210	0,32	\$ 67,20
	Caja de disección	Mediana	1	16	\$ 16,00
	Papel Parafilm	Mediana	1	64	\$ 64,00
	Agar papa dextrosa	Grande	1	78	\$ 78,00
	Antibiótico Genta Max 280	Mediana	10	0,9	\$ 9,00
	Papel absorbente	Mediana	3	3	\$ 9,00
	Plástico film de cocina	Mediana	4	3	\$ 12,00
Sub total de actividades					\$ 267,70
Objetivo 2					
Actividad 2					
Rubro General	Detalle	Tamaño	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Conteo UFC	aza	Mediano	1	2,5	\$ 2,50

	Tubos de ensayo	Medianos	5	1	\$ 5,00
Insumos	botellas de plástico	Mediano	28	0,25	\$ 7,00
	Sustrato	40 lb	40	0,35	\$ 14,00
	Tierra negra	1 qq	1	3,5	\$ 3,50
Toma de datos	Esfero	Mediano	1	0,35	\$ 0,35
	Cuaderno	Grande	1	2,5	\$ 2,50
	Fundas de basura	Grandes	6	0,2	\$ 1,20
	chisguete	Mediano	1	1,5	\$ 1,50
Sub total de actividades					\$ 37,55
Objetivo 3					
Actividad 3					
Rubro General	Detalle	Tamaño	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Transporte	Bus moto, camioneta	Integrante	20	2	\$ 40,00
Sub total de actividades					
TOTAL					\$ 345,25

Anexo 7. Medios de cultivo para la multiplicación del hongo *Beauveria bassiana*.



Anexo 8. Acondicionamiento de la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).



Anexo 9. Implementación del ensayo experimental.



Anexo 10. Multiplicación del hongo *Beauveria bassiana*.



Anexo 11. Preparación de la solución para conteo de conidios mediante soluciones seriadas.



Anexo 12. Suspensión de *Beauveria bassiana* y elaboración de la solución madre para aplicación.



Anexo 13. Aplicación de las diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* en el ensayo.



Anexo 14. Libro de campo



Anexo 15. Canteo de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) entre vivas y muertas.



Anexo 16. Síntomas que presento (*Phyllophaga spp.*) después de la senescencia.



Anexo 17. Verificación de la muerte de las larvas de *Phyllophaga spp.*) por *Beauveria bassiana*



Anexo 18. Protocolo



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PROTOCOLO PARA LA MULTIPLICACIÓN DE *Beauveria bassiana*

AUTOR:

Azogue Gavilanez Wellington David

TUTOR:

Ing. Chancusig Espín Edwin Marcelo, Ph.D.

CO-TUTORA:

Ing. Tania Elizabeth Llanos Proaño, Mg

LATACUNGA-ECUADOR

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	51
INDICE DE FIGURAS	52
1. INTRODUCCIÒN	53
1.1 Hongos entomopatògenos	53
1.2 <i>Beauveria Bassiana</i>	53
1.3 Modo de acci3n de <i>Beauveria bassiana</i>	54
2. ESTERILIZACIÒN	55
3. PREPARACI3N DE MEDIO DE CULTIVO	56
3.1 Medio de cultivo	56
3.2 Incubaci3n	56
3.3 Preparaci3n de soluci3n madre	56
3.3.1 Esterilizaci3n	56
3.3.2 Cosecha de micelios	57
3.3.3 Procedimiento en la c3mara laminar	57
3.3.4 Preparaci3n de concentraciones	57
3.3.4 Determinaci3n de la concentraci3n de conidios (cuantificaci3n en la c3mara de Neubauer)	58
3.3.5 Colecta de larvas (<i>Phyllophaga spp.</i>)	58
3.3.6 Implementaci3n del ensayo	59
3.3.7 Exposici3n del hongo en las larvas	59
3.3.8 Evaluaci3n del ensayo	59
3.3.9 Identificaci3n de los insectos muertos	59
4 BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de <i>Beauveria bassiana</i>	55
Figura 2. Instrumental esterilizado.....	55
Figura 3. Preparación de concentraciones.....	57
Figura 4. Conteo en la cámara de Neubauer	58
Figura 5. Colecta de Larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.....	59
Figura 6. Larvas muertos por la acción de <i>Beauveria bassiana</i>	60

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de metodologías bien establecidas es esencial para la multiplicación de microorganismos benéficos, como es el caso de *Beauveria bassiana* que fue descrito por primera vez por Jean Beaverie en el año de 1911. Corresponde a un patógeno natural de los insectos, donde sus esporas identifican la cubierta del insecto plaga, ingresa en su interior en el cual libera una serie de sustancias que lo digieren y lo destruyen.

Se encuentra principalmente como un habitante natural en el ambiente del suelo. Este hongo entomopatógeno se ha utilizado para controlar plagas de una amplia variedad de cultivos. Puede parasitar alrededor de 700 especies de insectos, que pertenecen a la división Ascomycota (Barra, et al., 2020).

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se consideran enemigos por naturaleza de los insectos, pueden llegar a exterminar grandes poblaciones de plagas sin causar algún daño a la salud humana y el medio ambiente. Se les denomina hongos del género *Beauveria* que son muy eficientes para el control de varios insectos por su alta patogenicidad al traspasar en el hemocele de su hospedero y causarle la muerte tras producir toxinas. Las esporas del hongo inician su contacto con la superficie quitinosa del insecto, es cuando inicia el mecanismo entomopatógeno de adhesión, germinación y penetración por medio de enzimas proteasas, quitinasas y dentro del huésped contrarresta los mecanismos inmunes del insecto produciendo efectos nocivos y continuamente la muerte, (Puentes & Quintana, 2021).

1.1 *Beauveria Bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógenos que en la actualidad es utilizada como insecticida biológico por su eficacia contra plagas de amplia variedad y de gran importancia, como; cítricos, hortalizas y frutales. Algunos de los insectos que puede combatir son: trips, mosca blanca, pulgones, ácaros, etc.

Beauveria bassiana corresponde a un hongo entomopatógeno que cuenta con la capacidad de producir metabolitos secundarios, generalmente son depsipéptidos cíclicos complejos de bajo peso molecular como: *beauvericina*, *beauverólidos* y *basianólido*, que tienen actividades antibacterianas, anti fúngicas, citotóxicos e insecticidas, poseen baja toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo, (Chávez, et al., 2014).

En la producción del hongo se pudo observar que gracias a las medidas de higiene exigidas para ingresar al laboratorio, se logró disminuir la contaminación del medio y con esto demostrar que en el instituto también puede producir hongo *Beauveria bassiana*. La cual se puede lograr a bajo costo y se puede reducir el uso de insecticidas, que favorecería el aspecto económico de los productores en sus cultivos al adquirirlo a bajo costo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya. Con respecto al efecto del hongo *Beauveria bassiana* en la *Hypsyphyla grandella* es muy efectivo en la etapa de laboratorio en la cual se tienen condiciones controladas, (Quintana, 2014)

1.2 Modo de acción de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo capaz de infectar a más de 200 especies de insectos, es de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso, el ciclo de vida de este hongo es de: la patogénica y la saprofitica. El crecimiento del hongo está dividido en ocho etapas: (INTAGRI, 2009)

- **Adhesión.** El primer encuentro del insecto y el hongo entomopatógeno ocurre cuando la espora (conidio) es depositada en la superficie del insecto.
- **Germinación.** La espora inicia el desarrollo del tubo germinativo, es un órgano sujetador llamado apresorio y esto le permite fijarse en el insecto, para una adecuada germinación requiere una humedad relativa del 92% y una temperatura entre 23 a 25°C.
- **Penetración.** El hongo ingresa por las partes blandas del insecto, gracias a la fijación de mecanismos físicos (presión sobre la superficie) y químicos (acción de enzimas: proteasas, lipasas y quitinasas).
- **Producción de toxinas:** dentro del insecto el hongo coloniza y ramifica en las cavidades del insecto, ahí es cuando produce una toxina denominada *Beauvericina* que ayuda a romper el sistema inmunológico del patógeno, produciendo también toxinas de *beauvericin*, *beauverilides*, *bassianolide*, *isarolides*, ácido oxálico y los pigmentos *bassianina* y *tenellina* que han demostrado poca actividad insecticida.
- **Muerte del insecto.** La muerte del insecto da como fin la fase parasitaria.
- **Multiplicación y crecimiento.** Después de la muerte del insecto viene a multiplicarse las hifas, provocando la muerte de los insectos. Después de la invasión el desarrollo del hongo sobre el insecto depende de la humedad relativa, (INTAGRI, 2009).

Figura 6. Modo de acción de *Beauveria bassiana*



Fuente: (Cuervo Mulet & Cali, 2010)

2. ESTERILIZACIÓN

La esterilización de la cristalería y los medios de cultivo garantiza una condición libre de gérmenes que permite un funcionamiento sin problemas. La forma más común de esterilización es mediante calor húmedo o presión de vapor en un autoclave, (Lugo, y otros, 2012).

Figura 7. Instrumental esterilizado





3. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

3.1 Medio de cultivo

Se utilizará la metodología empleada por (Ramírez H. G., 2014), para la preparación del medio de cultivo PDA, se realiza en los siguientes pasos:

- En una base de precipitación esterilizada se midió 400ml de agua destilada
- Se pesó 15,6 gr de agar nutritivo sólido en una balanza analítica, se procedió a verter en los 400 ml de agua dando una disolución que abastece para 20 cajas Petri, actividad que se ejecutó 2 veces por semana durante un mes y medio.
- Se agitó la botella de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea, terminado este proceso se llevó a la autoclave para ser esterilizado a 35 °C por 35 minutos.
- Al terminar el tiempo de esterilización se agregó el antibiótico, que consistió en la aplicación de una ampolla de Genta Max de 280, para evitar la contaminación de bacterias en el medio de cultivo proceso que se realizó en la cámara laminar tras 15 min de enfriamiento de la disolución; disolución que fue repartido en cajas Petri de plástico y se dejó en reposo aproximadamente 10 minutos para que se solidifique

3.2 Incubación

Para la incubación se va utilizar una incubadora, se mantuvo la temperatura del medio de cultivo entre 25 y 37°C por 8 días. Tras la incubación en condiciones adecuadas, cada célula viable originó una colonia visible resultado de sucesivas divisiones celulares.

3.3 Preparación de solución madre

3.3.1 Esterilización

Introducir al autoclave pinzas, tijeras, punta de micropipetas, vasos, asa, probetas y agua destiladas todo envuelto en papel aluminio.

3.3.2 Cosecha de micelios

- Extraer las cajas Petri con presencia de micelios y con un asa bacteriológica se procedió a dar un raspado para desprender todas las esporas del medio de cultivo, esta suspensión se llenó en 300 ml de agua destilada purificada hasta tener una concentración aproximada a 10^8 conidios/ml.
- Agitar durante 10 minutos la solución para que se desprendan las partículas.

3.3.3 Procedimiento en la cámara laminar

- Encender el mechero en la cámara laminar para evitar contaminación de otros hongos y bacterias durante las actividades a realizar.
- Colocar todos los insumos de trabajo (2 micropipetas de 100 μ L y una de 200, 3 tubos eppendorf, 6 pipetas de punta amarillas, un vaso de precipitación, parafilm, vòrtex, cajas con agua agar, agua destilada previamente desinfectada).
- Con la micropipeta de 200 μ L colocar el agua destilada en un tubo eppendorf repetir este proceso 4 veces hasta obtener 800 μ L en los 2 tubos eppendorf.
- Realizar la segunda disolución, con 100 μ L de la solución madre y agregar 90 μ L de agua destilada, cambiar la pipeta de punta amarilla y con la misma micropipeta 100 μ L colocar la solución que contiene el hongo, contenido de 1 ml en cada eppendorf.
- Agitar en un vortex por un espacio de 10 segundos.

3.3.4 Preparación de concentraciones

- En un tubo de ensayo dispensar 10 ml de la solución madre previamente para agitar durante 50 segundos.
- Tomar 1 ml con una micropipeta de la solución madre y se colocó en el primer tubo de ensayo que contaba con 9 ml de agua purificada así aforando a 10 ml, previo a aquello se agito en el vórtex de igual manera durante 50 segundos.
- Esté método replicar sucesivamente en todos los tubos de ensayo hasta llegar a la primera concentración 10^8 conidios/ml segunda concentración 10^9 conidios/ml y finalmente la tercera concentración 10^{10} conidios/ml.

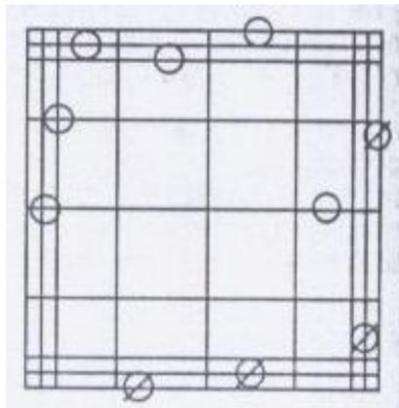
Figura 8. Preparación de concentraciones



3.3.4 Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en la cámara de Neubauer)

- Con una micropipeta de 20 μm se extraer de la última muestra de las soluciones seriadas, se transfirió 60 μm a la cámara de Neubauer hasta que por capilaridad se llene un lado de la cámara. Se llevó la cámara al microscopio y se observó con el lente 10x, para esta actividad ubicar el lente en el primer cuadrante (superior izquierdo), se cuantifico las esporas presentes en el cuadrante central como indica la figura.

Figura 9. conteo en la cámara de Neubauer



Fuente: (Ramírez H. G., 2014)

El resultado obtener con la aplicación de la siguiente formula escrito por Ramírez, et al, (2014).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Total de larvas muertas}}{\text{Cuadrantes contabilizados}} * \frac{10000}{\text{Número de subcuadrantes contabilizadas}}$$

3.3.5 Colecta de larvas (*Phyllophaga spp.*)

Recolectar larvas especialmente del tercer estadio de (*Phyllophaga spp.*) en los cual se depositaron en recipientes plásticos mismos que contienen una cantidad de turba y tierra como alimentación para luego ser trasladados al laboratorio del campus Salache.

Figura 10. Colecta de Larvas de *Phyllophaga spp.*



3.3.6 Implementación del ensayo

Las larvas recolectadas desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5% y luego enjuagarles con agua destilada estéril y secarlas en papel absorbente. Escoger 280 larvas de tercer estadio y se colocar en 14 recipientes plásticos estériles y 14 recipientes no estériles mismos que llegaran a contener 10 larvas de (*Phyllophaga spp.*) cada uno a una profundidad de 15 - 20 cm.

3.3.7 Exposición del hongo en las larvas

La inoculación del hongo en las larvas se dará en todos los tratamientos en una cantidad de 12.5 ml del hongo en estado líquido con un roseador en cada uno de la unidad experimental, a excepción de los adicionales.

3.3.8 Evaluación del ensayo

La aplicación de las concentraciones de conidios se ejecutará cada 5 días, registrándose datos de mortalidad de las larvas cada 3 días durante 40 días. Para esta actividad se contabilizó las larvas muertas después de la inoculación de *Beauveria bassiana*.

Para calcular el porcentaje de mortalidad se utilizará la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Total de larvas muertas}}{\text{Población inicial}} * 100$$

3.3.9 Identificación de los insectos muertos

Las larvas muertas se colocarán en la incubadora con medio de cultivo hasta la emergencia del hongo.

Figura 11. Larvas muertas por la acción de *Beauveria bassiana*



4 BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, O. M. (2006). Determinación de agresividad de hongos entomopatógenos para *Macrobrachium* sp. (Cazzo del maíz). En O. M. Ayala, *Determinación de agresividad de hongos entomopatógenos para Macrobrachium sp. (Cazzo del maíz)* (págs. 20 - 21). Quito- Ecuador: INIAP.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Obtenido de <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>.

- INTAGRI. (2009). Beauveria bassiana en el Control Biológico de Patógenos. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
- Lugo, C., Morales, García, Y., Pazos, Ramírez, Valverde, . . . Rojas , J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revisión Colombiana de Biotecnología* , 147- 156.
- Puentes, A. H., & Quintana, A. M. (24 de Abril de 2021). Effect of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana (balsamo) Vuillemin on the control of sheep ked (Melophagus ovinus). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172021000200021&script=sci_arttext
- Quintana, J. S. (Diciembre de 2014). Producción y aplicación del hongo Beauveria. Obtenido de http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/for/for-2014-5.pdf
- Ramírez, H. G. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Servicio Nacional de Sanidad Agraria, (SANASA) SCB*. Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>

Anexo 19. Aval de Traductor

UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE
COTOPAXI



CENTRO
DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOSPÓRICO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE, LATACUNGA, COTOPAXI 2022”** presentado por: **AZOGUE GAVILANEZ WELLINGTON DAVID**, egresado de la Carrera de: **Carrera de Agronomía**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, 07 de septiembre del 2022

Atentamente,

Mg. Sc Nelson Guagchinga

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC

CI: 0503246415