



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO
PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES
DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 2022.”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Ingeniera Agrónoma.

Autora:

Bermudez Changoluisa Valeria Alejandra.

Tutor:

Chancusig Espín Edwin Marcelo. Ing. Ph.D.

LATACUNGA-ECUADOR

Marzo 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Valeria Alejandra Bermudez Changoluisa, con cédula de ciudadanía **0504180597**, declaro ser la autora del presente proyecto de investigación: **“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 2022.”** siendo el Ingeniero Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig, 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, 21 de marzo del 2022

Valeria Alejandra Bermudez Changoluisa

Estudiante

CC: 0504180597

Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig

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 **BERMUDEZ CHANGOLUISA VALERIA ALEJANDRA**, identificado con cédula de ciudadanía **0504180597** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. 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. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería Agronómica, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado: **“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 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 2017 - Agosto 2017

Finalización de la carrera: Octubre 2021 – Marzo 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 7 de enero del 2022

Tutor: Ing. Mg. Edwin Marcelo Chancusig, Ph.D.

Tema: **“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 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, **LA 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 **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- 1.1. La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- 1.1. La publicación del trabajo de grado.
- 1.1. La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- 1.1. La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- 1.1. 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 **LA 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 **LA 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 21 días del mes de marzo del 2022.

Valeria Alejandra Bermudez Changoluisa
LA CEDENTE

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 2022.” de Bermudez Changoluisa Valeria Alejandra, de la carrera de Ingeniería Agronómica, 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, 21 de marzo del 2022

Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig

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, la postulante: Bermudez Changoluisa Valeria Alejandra, con el título de Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 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 los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 21 de marzo del 2022

Lector 1 (Presidente)

Ing. Mg. Wilman Paolo Chasi Vizquete

CC: 0502409725

Lector 2

Ing. Mg. Diana Toapanta Gallegos

CC: 1002749800

Lector 3

Ing. Mg. Richard Alcides Molina Alvarez

CC: 1205974627

AGRADECIMIENTO

Primeramente, doy gracia a Dios por sus infinitas bendiciones, vida, salud, amor y por haberme otorgado una maravillosa familia, quienes han creído siempre en mí, en especial a mi madre quien es mi fortaleza y motor para seguir adelante.

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

Al Ing. Edwin Chancusig, tutor de la tesis por su apoyo y contribución en el desarrollo de esta investigación, a la Ing. Tania Llanos quien supo encaminarnos en la parte práctica de la investigación.

También quiero expresar un fraterno agradecimiento a mis lectores el Ing. Paolo Chasi, Ing. Richard Molina y la Ing. Diana Toapanta quienes aportaron con sus conocimientos para la culminación de este trabajo.

Valeria Alejandra Bermudez

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 Rita Changoluisa por su apoyo incondicional, amor, esfuerzo y valentía.

A mi padre Francisco Changoluisa por ser un hombre admirable, lleno de virtudes quien con su amor, paciencia y sabiduría hizo la mujer que soy hoy en día, enseñándome a valorar la vida, que con valentía y esfuerzo todo es posible.

Valeria

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: Evaluación de *Beauveria bassiana* aislado del estiércol de conejo para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de Laboratorio Campus Salache 2021 – 2022.

AUTOR: Valeria Bermúdez

RESUMEN

La investigación se realizó con la finalidad de plantear alternativas para el control de plagas mediante el uso de biocontroladores, cuyo objetivo general fue evaluar *Beauveria bassiana* aislado del estiércol de conejo para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de Laboratorio Campus Salache 2021 -2022. Se realizaron los siguientes objetivos específicos: Obtener *Beauveria bassiana* del estiércol de conejo, se determinó la mejor concentración para la aplicación de *Beauveria bassiana* en el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) y finalmente se identificó la presencia de *Beauveria bassiana* en individuos muertos. Se aplicó un diseño de Bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial A x B + 1, obteniendo siete tratamientos con cinco repeticiones, donde el factor A corresponde a las concentraciones (10⁴, 10⁶,10⁸), el factor B a los tipos de aplicación (aspersión e inmersión), con los datos obtenidos de la investigación se procedió a la tabulación y análisis estadístico prueba Tukey al 5% se determinó el mejor tratamiento en función a la variable a evaluar que fue: el porcentaje de mortalidad, datos analizados en el programa InfoStat. Inicialmente se identificó, aisló, purificó, cuantificó y realizó medios de cultivo con larvas muertas, para determinar el índice de mortalidad. Los resultados que se obtuvieron en la concentración 10⁸ (T5) de *Beauveria bassiana* controló el 100% de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) seguido por el tratamiento seis con 74,4% de individuos muertos.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Phyllophaga spp*, concentraciones, índice de mortalidad.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES FACULTY

THEME: *Beauveria bassiana* evaluation isolated from rabbit manure for Blind Hen control (*Phyllophaga spp.*), under Salache Campus Laboratory conditions 2021 – 2022

AUTHOR: Valeria Bermudez

ABSTRACT

This research was carried out with the purpose to propose for pest control alternatives through biocontrollers use, whose general objective was to evaluate *Beauveria bassiana* isolated it from rabbit manure for Blind Hen (*Phyllophaga spp.*), at Salache Campus Laboratory 2021 -2022. The following specific objectives were carried out: To obtain *Beauveria bassiana* from rabbit manure, the best concentration for *Beauveria bassiana* application on Blind Hen control (*Phyllophaga spp.*) was determined and finally *Beauveria bassiana* presence on dead individuals was identified. A completely randomized block design (DBCA) with factorial arrangement A x B + 1 was applied, obtaining seven treatments with five repetitions, where factor A corresponds to concentrations (10^4 , 10^6 , 10^8), factor B to application types (sprinkler and immersion), with obtained data from the investigation, it was proceeded to tabulate and statistically analyze Tukey test at 5%, the best treatment was determined based on the variable to be evaluated, which was: mortality percentage, data analyzed on InfoStat program. Initially, it was identified, isolated, purified, quantified and made culture media with dead larvae, to determine mortality rate. Obtained results in concentration 10^8 (T5) of *Beauveria bassiana* controlled 100% of Blind Hen (*Phyllophaga spp.*) followed by treatment six with 74.4% of dead individuals.

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

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vii
AGRADECIMIENTO	viii
DEDICATORIA	ix
RESUMEN.....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xviii
1. INFORMACIÒN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÒN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÒN	3
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÒN	4
4.1. Beneficiarios Directos	4
4.2. Beneficiarios Indirectos	4
5. PROBLEMÀTICA	5
6. OBJETIVOS.....	6
6.1. Objetivo general	6
6.2. Objetivos Específicos.....	6

8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	8
8.1. Antecedentes de Investigación.....	8
8.2. Marco Teórico.....	10
8.2.1. <i>Phyllophaga spp.</i>	10
8.2.2. Taxonomía de <i>Phyllophaga spp.</i>	11
8.2.3. Ciclo de Vida de <i>Phyllophaga spp.</i>	12
8.2.4. Daños provocados por <i>Phyllophaga spp.</i>	13
8.2.5. <i>Beauveria bassiana</i>	13
8.2.6. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	15
8.2.7. Modo de Acción de <i>Beauveria bassiana</i>	15
8.2.8. Morfología de <i>Beauveria bassiana</i>	16
8.2.9. Bioplaguicidas.....	16
8.2.10. Actividad Biocontroladora.....	17
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.....	19
10.3. Modalidad básica de investigación.....	20
10.3.1. De Laboratorio	20
10.3.2. Bibliográfica Documental	20
10.4. Análisis estadístico	20
10.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	20
10.5.1. Observación de campo.....	20
10.6.1. Materia Prima.....	20
10.6.2. Reactivos	21

10.6.3. Materiales de Laboratorio	21
10.6.4. Materiales para el ensayo	21
10.7. Equipos.....	21
10.8. Diseño Experimental	21
10.8.1. Factor en estudio	22
10.9. Operacionalización de Variables	23
10.11. Metodología del aislamiento	24
10.11.1. Procedencia de las muestras experimentales	24
10.12.2. Preparación de medio de cultivo.....	24
10.13.3. Aislamiento	24
10.14.4. Incubación.....	24
10.14.5. Purificación	25
10.14.6. Identificación	25
10.14.7. Morfología	26
10.15. Cultivo monoespórico.....	26
10.15.1. Esterilización.....	26
10.15.2. Preparación de medio de cultivo Agar agua (AA)	26
10.15.3. Cosecha de micelios	26
10.15.4. Cámara laminar	27
10.15.5. Solución pura	27
10.16. Conteo de colonias	27
10.16.1. Preparación de disoluciones seriadas	29
10.16.2. Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en la cámara Neubauer).....	29
10.17. Colecta de larvas (<i>Phyllophaga</i> spp.)	30
10.18. Implementación del ensayo	30
10.18.1. Exposición de las larvas al hongo.....	30

10.18.2. Inmersión	30
10.18.3. Aspersión	31
10.19. Evaluación del ensayo	31
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades y Sistemas en relación a los Objetivos	6
Tabla 2. Taxonomía de <i>Phyllophaga spp.</i>	11
Tabla 3. Ciclo de Vida de <i>Phyllophaga spp</i>	12
Tabla 4. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	15
Tabla 5. Ubicación geográfica del ensayo.....	19
Tabla 6. Esquema del Adeva.....	22
Tabla 7. Tratamientos en estudio.....	22
Tabla 8. Variables e indicadores.....	23
Tabla 10. Análisis de Varianza del Porcentaje de Mortalidad	34
Tabla 11. Contrastes Ortogonales testigo vs tratamientos	34
Tabla 12. Contraste del Factor A.....	35
Tabla 13. Prueba de Tukey para el Factor A	35
Tabla 14. Contraste del Factor B	36
Tabla 15. Prueba de Tukey para el Factor B	37
Tabla 16. Contraste Fator A*B.....	37
Tabla17. Prueba de Tukey para el Factor B	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Phyllophaga spp.</i> en estado de larva	11
Figura 2. <i>Beauveria bassiana</i> en el control biológico de Insectos	14
Figura 3. Ubicación del Campus Salache.....	18
Figura 4. Hongo entomopatígeno <i>B. bassiana</i> aislado a partir de estiércol de conejo	25
Figura 5. Cámara de Neubauer.....	29
Figura 6. Esporulación de <i>B. bassiana</i> en gallina ciega.....	31
Figura 7. Prueba de Tukey para el Factor A.....	36
Figura 8. Prueba de Tukey para el Factor B.....	37
Figura 9. Prueba de Tukey para el Factor A* B	39
Figura 10. Porcentaje de Mortalidad por semanas utilizando la fórmula de Poisson	39
Figura 11. Porcentaje de Mortalidad por semanas	40
Figura 12. Porcentaje de Mortalidad.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Aval de traducción	50
Anexo 2. Informe de anti plagio.....	51
Anexo 3. Análisis taxonómico	52
Anexo 3. Recolección de estiércol de conejo con presencia de micelios.	54
Anexo 4. Recolección de larvas (<i>Phyllophaga spp.</i>)	54
Anexo 5. Aislamiento e Identificación de muestras de estiércol de conejo.....	54
Anexo 6. Purificación de muestras de <i>Beauveria bassiana</i>	55
Anexo 7. Cuantificación de conidios	55
Anexo 8. Suspensión de <i>B. bassiana</i>	55
Anexo 9. Inoculación de <i>Beauveria bassiana</i>	56
Anexo 10. Signo y síntomas que presento (<i>Phyllophaga spp.</i>) durante la investigación.....	56
Anexo 12. Manual de producción de <i>Beauveria bassiana</i>	56

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Evaluación de *Beauveria bassiana* aislado del estiércol de conejo en gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de Laboratorio Campus Salache 2021 -2022.

Fecha de inicio:

Octubre del 2021.

Fecha de finalización:

Marzo del 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:

Ingeniería Agronómica.

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: Valeria Alejandra Bermudez Changoluisa

Tutor: Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig

Lector 1: Ing. Mg. Wilman Paolo Chasi Vizuete

CC. 0502409725

Lector 2: Ing. Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos CC. 1002749800

Lector 3: Ing. Mg. Richard Alcides Molina Alvarez CC. 1205974627

Coordinador del Proyecto:

Nombre: Valeria Alejandra Bermudez Changoluisa

Teléfonos: 0979110948

Correo electrónico: valeria.bermudez0597@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura - Agricultura, silvicultura y pesca - producción agropecuaria

1.1. Línea de investigación:

1.2. Línea 1:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local

Esta línea está enfocada en la generación de conocimiento para un mejor aprovechamiento de la biodiversidad local, basado en la caracterización agronómica, morfológica, genómica, física, bioquímica y usos ancestrales de los recursos naturales locales. Esta información será fundamental para establecer planes de manejo, de producción y de conservación del patrimonio natural.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Caracterización de la biodiversidad

Línea de vinculación

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

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

En la presente investigación se evaluó el control que presenta *Beauveria bassiana* aislado del estiércol de conejo, que corresponde a un hongo que generalmente produce toxinas que tiene la

capacidad de romper el sistema inmune de un patógeno por lo que puede ser utilizado como un agente biocontrolador. De esta manera se pretende valorar dicha actividad frente al patógeno conocido comúnmente como gallina ciega denominado *Phyllophaga spp.* un gusano que afecta a una variedad de cultivos y que ha causado grandes pérdidas a nivel de la producción.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales factores negativos para cualquier tipo de cultivo son las plagas, siendo la principal la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) que generalmente promueven una gran cantidad de daños y la disminución del rendimiento de la producción entre el 20-40% en la caña de azúcar, maíz, tomate, frutales y pastizales. Principalmente consumen las raíces de las distintas plantas desde las etapas iniciales del cultivo, donde las plantas presentan una coloración violeta por la falta del fósforo y el daño de las raíces por lo que la planta muere (Chávez, et al., 2014).

De esta manera es muy importante la identificación de productos que actúen en contra de las plagas. Estos productos son identificados como insecticidas, sin embargo, al ser estos productos químicos generan una alta contaminación tanto para el medio ambiente como para la salud humana. El uso frecuente de este tipo de productos ha ocasionado múltiples crisis en el ámbito de la agricultura debido a que efectúa daños en la prevención de los ecosistemas, los recursos naturales y afecciones en la salud de las comunidades rurales y los consumidores urbanas (Del Puerto, Suárez, & Palacio, 2014).

En el Ecuador se estima que el 77,90% de agricultores usan con mayor frecuencia tanto en cultivos que son transitorios como en permanentes, siendo los más utilizados los insecticidas que cuentan con hidrocarburos clorados, organofosfatos y carbamatos (INEC, 2014). Por otra parte, se ha evidenciado en los últimos años que en el país se ha incrementado la importación de agroquímicos, donde los insecticidas presentan una incidencia del 15%, es decir alrededor de dos millones de insecticidas para el año 2016 (FAO, 2016).

A raíz de todo esto es necesario la búsqueda de microorganismos que tengan la capacidad de desarrollar actividad biocontroladora frente a múltiples plagas, incluida la gallina ciega. Uno de estos microorganismos corresponde a *Beauveria bassiana* 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, antifúngicas, citotóxicos e insecticidas, poseen baja

toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo (Chávez, et al., 2014).

En el presente proyecto se pretende evaluar *Beauveria bassiana* aislado del estiércol de conejo al patógeno conocido comúnmente como gallina ciega denominado *Phyllophaga spp.* en los laboratorios del campus Salache.

Por otra parte, este proyecto beneficiará tanto a los agricultores, productores y consumidores de la localidad debido a que generalmente desconocen de los beneficios biocontroladores que presentan los microorganismos, en este caso *Beauveria bassiana*, con el fin de que en un futuro opten por productos biológicos favoreciendo tanto al medio ambiente como a los seres humanos.

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Beneficiarios Directos

Los beneficiarios directos del presente proyecto de investigación son los agricultores, productores, exportadores de la localidad debido a que se puede aplicar el hongo entomopatógeno como un agente biocontrolador.

Otros beneficiarios directos corresponden tanto a los docentes como a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Cotopaxi quienes identificarán la potencialidad que presenta el Ecuador para la producción de bioplaguicidas.

4.2. Beneficiarios Indirectos

Los beneficiarios indirectos corresponden a los consumidores de productos vegetales quienes generalmente presentan inconvenientes de salud por consumir productos contaminados por una gran cantidad de químicos.

5. PROBLEMÁTICA

Phyllophaga spp. es considerada una plaga de importancia mundial la cual provoca una serie de daños debido a que las larvas se alimentan de las raíces debilitando a la planta de forma externa con la presencia de hojas amarillosas y peciolo morados, con un poco vigor donde se presentan falta de nutrición, esterilidad, trastornos irreversibles lo que ocasiona pérdidas que van desde el 10 al 100 % de la producción (Paqui & Morales, 2020).

Este insecto presenta una alta distribución geográfica en Latinoamérica se extiende desde Estados Unidos hasta América del Sur donde generalmente provocan daños en los siguientes cultivos: papa, repollo, maíz, frijón, arroz, tomate, culantro, chiltoma, caña de azúcar y melón (Del Puerto, et al., 2014).

A nivel de Latinoamérica, México es uno de los países de mayor afectación en los cultivos de maíz, disminuyendo la producción en alrededor del 20% por el efecto de las plagas (Lugo , et al., 2012).

Por otra parte, se ha evidenciado que el cambio climático ha impactado de manera directa a los suelos del Ecuador. Los problemas ambientales con el suelo ecuatoriano tienen relación con los procesos erosivos y la pérdida de calidad por acción de múltiples contaminantes. Esta degradación se debe a la sobreutilización del suelo, y a la alteración de las características tanto físicas, como químicas y biológicas del suelo. Esta última debido a la excesiva utilización de productos agrícolas con el fin de incrementar la productividad del suelo (Puentes, 2015).

De esta manera es muy importante fomentar alternativas de control de plagas, por medio del control biológico como el uso de microorganismos que en la actualidad han sido implementados en una serie de cultivos. Por otra parte, la presente investigación radica en promover conocimientos en la ciudadanía, para optar por nuevas alternativas amigables con el medio ambiente, haciendo énfasis en los bioplaguicidas.

6.OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Evaluar *Beauveria bassiana* aislada del estiércol de conejo para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de laboratorio.

6.2.Objetivos Específicos

- Obtener *Beauveria bassiana* del estiércol de conejo.
- Determinar la mejor concentración para la aplicación de *Beauveria bassiana* en el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).
- Identificar la presencia de *Beauveria bassiana* en individuos muertos.

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
<p>OBJETIVO 1</p> <p>Obtener <i>Beauveria bassiana</i> del estiércol de conejo.</p>	<p>Recolección de muestras de estiércol de conejo con presencia de micelios.</p> <p>Traslado de muestras al Laboratorio de la carrera de agronomía.</p> <p>Selección de muestras de estiércol de conejo con mayor porcentaje de micelios.</p> <p>Ubicación de materiales en la autoclave para su desinfección.</p>	<p>Diferentes muestras de estiércol de conejo con presencia de micelios.</p> <p>Desinfección de equipos y materiales.</p>	<p>Fotografías</p> <p>Análisis taxonómico de <i>Beauveria</i>.</p> <p>Facturas de insumos</p>

	<p>Pesaje de (PDA) en la balanza analítica.</p> <p>Disolución de Agar en agua destilada.</p> <p>Esterilización de disolución.</p> <p>Distribución de disolución (AGAR) en las diferentes cajas Petri.</p> <p>Incubación y purificación del hongo a 37°C por 8 días.</p> <p>Aislamiento de <i>Beauveria</i> a partir de estiércol de conejo, utilizando diferentes medios de cultivo.</p> <p>Caracterización de muestras aisladas a partir del método de tinción simple observadas a través del microscopio.</p>	<p>Preparación de medio de cultivo (PDA)</p> <p><i>Beauveria bassiana</i> a partir de estiércol de conejo</p> <p>Identificación de <i>Beauveria</i> aislada.</p>	
<p>OBJETIVO 2</p> <p>Determinar la mejor concentración para la aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en el control de gallina ciega (<i>Phyllophaga spp.</i>).</p>	<p>Elaboración de medio de cultivo en varias cajas Petri.</p> <p>Re - aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i></p> <p>Reproducción de cajas Petri purificadas.</p> <p>Disoluciones seriadas</p> <p>Conteo de esporas.</p> <p>Diferentes concentraciones de conidios.</p> <p>Inoculación de larvas por aspersión e inmersión.</p>	<p>Multiplicación de <i>Beauveria bassiana</i>.</p> <p>Determinación de las diferentes dosis para la aplicación en control de gallina ciega (<i>Phyllophaga spp.</i>)</p>	<p>Fotografías</p> <p>Tablas de medias estadísticas de concentraciones.</p>

	Registro y tabulación de datos		
OBJETIVO 3			
Identificar la presencia de <i>Beauveria bassiana</i> en individuos muertos.	Sembrar <i>Beauveria bassiana</i> en medio con <i>Phyllophaga spp.</i> Determinar halos de inhibición del medio de cultivo.	Porcentajes de mortalidad de larvas por infección micótica.	Registro fotográfico de estructuras encontrada.

CAPÍTULO I

8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

8.1. Antecedentes de Investigación

Ayodeji, et al., (2020) realizó una revisión sistemática sobre el potencial biotecnológico de *Beauveria bassiana* como una nueva fuente de biocatalizadores y metabolitos. Definieron que este microorganismo es un hongo entomopatógeno que en ciertas ocasiones es identificado en la naturaleza como un ser endófito. Cuando se trata de un entomopatógeno este presenta un ciclo de vida de diferentes etapas, donde se adapta a manera de un patógeno en huéspedes invertebrados. Cuando es un hongo endófito se da una relación simbiótica con sus huéspedes vegetales. Para dar cumplimiento con esta función este hongo secreta tanto enzimas como metabolitos secundarios con una alta importancia biológica. Las quitinasas, lipasas y proteasas se consideran las más importantes de todas las enzimas producidas por *B. bassiana*, sin embargo, los estudios se ha demostrado su capacidad para producir otras enzimas vitales que incluyen amilasa, asparaginasa, celulasa, galactosidasa, etc.

Barra, et al., (2020) realizaron una investigación sobre la actividad antifúngica que presenta *Beauveria bassiana* de tipo endófito en contra de *Botrytis cinerea*. *Botrytis cinerea* causa pérdidas sustanciales en los cultivos de tomate y chile en todo el mundo. Se evaluó la capacidad de colonización de cepas endófitas nativas de *Beauveria bassiana* y su efecto antifúngico contra

B. cinerea en cultivos de solanáceas. Se aplicó un empapado de raíces con *B. bassiana* y se determinó la capacidad de colonización endofítica en raíces, tallos y hojas. La actividad antagonista se evaluó usando cultivo dual *in vitro* y también plantas empapando el endófito en la raíz y por inoculación del patógeno en las hojas. Diez cepas nativas fueron endófitas de tomate y ocho fueron endófitas de chile. Todas las cepas mostraron un antagonismo *in vitro* significativo contra *B. cinerea* (30-36%). Se observó un alto efecto antifúngico y las cepas RGM547 y RGM644 mostraron el menor porcentaje de superficie afectada por el patógeno. Cepas nativas de *B. bassiana* colonizaron tejidos de tomate y chile y proporcionaron niveles importantes de antagonismo contra *B. cinerea*.

Russo, et al., (2019) realizaron una investigación sobre los efectos endófitos de *Beauveria bassiana* en maíz y su herbívoro *Rachiplusia nu*. Los hongos entomopatógenos son ampliamente reconocidos como agentes de control biológico a nivel mundial. El propósito de esta investigación fue evaluar el crecimiento y rendimiento de plantas de maíz colonizadas con *Beauveria bassiana* y su efecto sobre la plaga de lepidópteros *Rachiplusia nu*. Los efectos del hongo sobre el crecimiento de las plantas, el rendimiento de los cultivos y la transmisión vertical se evaluaron en el campo. Las preferencias de alimentación de las larvas de *R. nu* se evaluaron en el laboratorio mediante una "prueba de elección". Las plantas de maíz inoculadas con *B. bassiana* mostraron un aumento en la altura, el número de hojas, el peso del grano, el rendimiento y el porcentaje de germinación de semillas en comparación con las plantas de control. El consumo de plantas de maíz colonizadas con *B. bassiana* por larvas de *R. nu* se redujo en comparación con los niveles de alimentación observados en plantas no inoculadas.

Afandhi, et al., (2019) realizaron una investigación sobre el crecimiento del frijol común con la ayuda del hongo endófito de *Beauveria bassiana*. El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es una fuente de proteína vegetal que contiene antioxidantes y es beneficiosa para la salud humana. Se aisló e identificó *B. bassiana*, además de examinar su función como endófito benéfico que promueve el crecimiento del frijol común. Se recolectó e identificó un hongo entomopatógeno *B. bassiana*, con base en las características macroscópicas y microscópicas que se observaron durante el examen morfológico. Se propagó e inoculó en frijol común mediante remojo de semillas, humedecimiento del suelo y aspersion de hojas. Los métodos de humectación del suelo y rociado de hojas utilizados para inocular *B. bassiana* mejoraron efectivamente el crecimiento del frijol común, que se observó en el día 10 después de la inoculación. Sin embargo, no se observó una mejora significativa del crecimiento del frijol común cuando se utilizó el método de inoculación por remojo de semillas.

Ronquillo (2021) realizó una investigación sobre el control biológico de *Cosmopolites sordidus* por medio del uso de cepas de *Beauveria bassiana* en un laboratorio. El objetivo general fue evaluar la eficacia de una serie de cepas de este hongo para el control biológico. Se trabajó bajo una metodología cuali-cuantitativa, método inductivo, deductivo y documental. Los insectos *C. sordidus* en estado de larva, pupa y adulto se recolectaron de los cormos de las plantas de banano afectadas en el campo. La inoculación del hongo en los insectos adultos de *C. sordidus* se realizó por microaspersión con micropipetas, dispersando las esporas de *B. bassiana* en la parte dorsal del insecto adulto con 5 días de emergencia. Los insectos adultos inoculados se colocaron en cajas Petri con 30 g de pseudotallo y 30 g de corno fresco, los cuales fueron previamente desinfectados en agua hirviendo por un lapso de 60 segundos. Para cada tratamiento se colocaron 5 insectos adultos en tres repeticiones, evaluados cada 5, 8 y 10 días después de la inoculación. El tratamiento 8 y el tratamiento 9 presentaron el mayor número de insectos muertos, 8 días después de la inoculación.

Mamani (2021) evaluó tres cepas de *Beauveria bassiana* para el control biológico de *Eloria noyesi* S. en el cultivo de coca en condiciones de laboratorio. Las larvas de *Eloria noyesi* fueron recolectadas, desinfectadas, lavadas y expuestas en soluciones fúngicas con una concentración igual a 1×10^7 conidias/mililitro por aspersión. Los resultados mostraron larvas patógenas en el promedio de los tratamientos. Se identificó un desarrollo del hongo *B. bassiana* sobre *Eloria noyesi* donde T1 (Cepa 9205) y T2 (Cepa 13) presentaron anomalías en el desarrollo, desintegrándose antes de llegar a la momificación, T3 (Cepa 24) obtuvo la momificación cubriendo todo el cuerpo de la larva por el hongo. Estos resultados permitieron concluir que existe variabilidad en términos de patogenicidad y virulencia, mostrando la calidad y el potencial agresivo (virulencia) de estas cepas.

8.2. Marco Teórico

8.2.1. *Phyllophaga* spp.

La gallina ciega corresponde a un coleóptero que pertenece a la familia *Scarabaeidae* considerada como una plaga rizófaga de mayor importancia en América Latina. *Phyllophaga* spp. genera una serie de daños debido a que generalmente las larvas se alimentan de las raíces debilitando a la planta de forma externa con la presencia de hojas amarillentas y peciolo morados, con poco vigor donde se presentan falta de nutrición, esterilidad, trastornos irreversibles lo que ocasiona finalmente la muerte de la planta (Altamirano, 2016).

La gallina ciega es considerada como especies fitófagas. Los huevos de esta especie presentan una forma oval, miden 2 milímetros de largo y uno de ancho. La larva por su parte es escarabeiforme, con una dimensión de 30 milímetros, con el cuerpo de color blanquecino y su cabeza de color café rojizo. Adulto. Coleópteros de forma oval, alargada, que miden de 15 a 18 mm de longitud (Fuentes, 2019).

En el Ecuador se ha evidenciado un alto índice de preocupación por parte de los agricultores por el ataque del insecto gallina ciega, que es un grupo de la familia Coleóptera. Este tipo de larvas cuentan con una gran capacidad para adaptarse, por lo que afectan una serie de cultivos, provocando altas pérdidas económicas. Son consideradas como plagas con una importancia a nivel mundial, habitan en el suelo a una profundidad entre 15-25 centímetros, alimentándose de las raíces de plantas destruyendo todo el sistema radicular (Morocho, et al., 2020).

Figura 1. Phyllophaga spp. en estado de larva



Fuente: Adaptado de Portillo (2017)

8.2.2. 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>

Fuente: Adaptado de Altamirano (2016)

8.2.3. Ciclo de Vida de *Phyllophaga spp.*

El ciclo de vida de este insecto oscila entre ocho y dieciséis meses, dependiendo de las condiciones climáticas, donde algunas pueden ser hasta 36 meses o más. A continuación, en la siguiente tabla se detalla las etapas del ciclo de vida de este insecto:

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

ETAPA DE CRECIMIENTO	DESCRIPCIÓN
<p>Huevo</p> 	<p>Una vez que el abdomen de la hembra es fecundado por el macho los huevos son depositados por debajo de la tierra. El tiempo de incubación de los huevos es de 12-15 días. Cada hembra deposita 100 huevos fertilizados.</p>
<p>Larvas</p> 	<p>Se alimentan de materia orgánica y pelos radicales. Se mantienen entre 21.32 semanas, donde crecen y mudan de piel por tres veces, y las grandes aparecen entre julio y octubre. A partir del mes de octubre las larvas se mantienen durante unos 5 febrero- 6 meses dentro de una cápsula en el suelo.</p>
<p>Pupa</p>	



Sufre mutaciones hasta convertirse en imago a finales de febrero e inicios de marzo. Presenta una coloración ámbar- parduzco.

Adulto



El adulto madura y permanece inactivo hasta que se rompe la celda o se induce la emergencia por a la filtración de agua, aparecen inicialmente los machos los cuales inician sus actividades de vuelo, en la búsqueda de comida.

Fuente: Adaptado de Tipán (2020)

8.2.4. Daños provocados por *Phyllophaga spp.*

Las larvas de *Phyllophaga spp.* principalmente se alimentan de las raíces de las plantas o árboles jóvenes, provocando generalmente su muerte. Las plantas afectadas por esta especie en base a lo mencionado por Fuentes (2019) son: Maíz, papa, agave, fréjol, arveja entre otras.

La gallina ciega es la plaga de suelo predominante en cultivos de Centroamérica, afecta el cacao, y gran cantidad de cultivos de diferentes familias botánicas. Los daños causados varían entre 10 y hasta 100 por ciento de las plantaciones. El daño principal lo causa al alimentarse activamente de las raíces. Además, provoca daños secundarios al alimentarse parcialmente y provoca lesiones por su daño, las cuales son una vía de introducción de patógenos del suelo, como bacterias y hongos. La gallina ciega se encuentra en casi todos los hábitats donde se establecen cultivos, desde 50 hasta 1750 metros sobre el nivel del mar (Arguello, 2019).

8.2.5. *Beauveria bassiana*

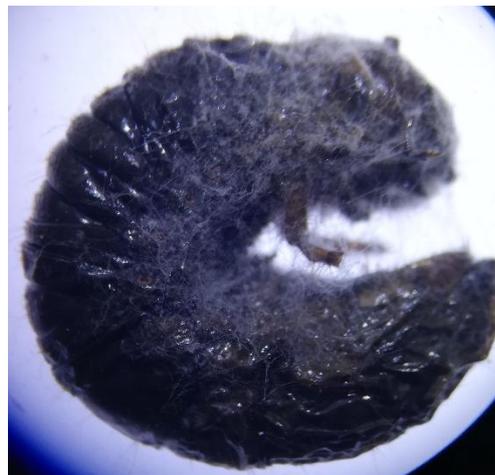
Beauveria bassiana fue descrito por primera vez por Jean Beaverie en el año de 1911. Corresponde a un patógeno natural de los insectos, donde sus esporas identifican la cubierta del

insecto plaga, ingresa en su interior en el cual libera una serie de sustancias que lo digieren y lo destruyen.

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, antifúngicas, citotóxicos e insecticidas, poseen baja toxicidad en humanos y no necesitan requerimientos especiales para su empleo (Chávez, et al., 2014).

Beauveria bassiana es un patógeno facultativo y se encuentra principalmente como un habitante natural en el ambiente del suelo. Este hongo se ha utilizado para controlar plagas de una amplia variedad de cultivos. Corresponde a un hongo entomopatógeno que puede parasitar alrededor de 700 especies de insectos, que pertenecen a la división Ascomycota. Se caracteriza por la presencia de células conidiógenas globosas a subglobosas con un cuello muy corto, las estructuras conidiógenas forman grandes grupos, conidióforos apiñados formando sinnemas o grupos de conidióforos muy juntos, las conidias son hialinas y lisas, globosas elipsoidales y raquis en forma de zíg-zag (Barra, et al., 2020).

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



Fuente: (Bermudez, 2022)

8.2.6. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Tabla 4. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

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

Fuente: Adaptado de Rivas (2020)

8.2.7. Modo de Acción de *Beauveria bassiana*

Históricamente, *B. bassiana* es más conocida como entomopatógeno. Los entomopatógenos fúngicos son únicos entre los patógenos de insectos en que en lugar de depender de que el insecto los coma o de que entren por una abertura (herida o natural), son capaces de ingresar al insecto directamente a través de la cutícula mediante la producción de enzimas (Contreras, 2019).

Las esporas pueden ser arrastradas por el viento o recogidas por el insecto a medida que se desplaza por su entorno. Las esporas son hidrófobas, lo que les permite adherirse a la cutícula del insecto. Las esporas de *Beauveria bassiana* requieren solo una fuente de carbono para germinar, y la germinación puede ocurrir después de solo unas pocas horas. Sin embargo, se requiere una fuente de nitrógeno para el crecimiento continuo (Da Silva, et al., 2020).

La germinación de las esporas se induce en la superficie de la cutícula del insecto, que está compuesta de hasta un 40% de quitina y sirve como fuente de carbono y nitrógeno. La molécula de quitina. Está compuesta por residuos alternados de N-acetilglucosamina, unidos por enlaces

β - (1-4) -glicosídicos. La quitina siempre está asociada con las proteínas de la cutícula que determinan las propiedades mecánicas de la cutícula. Tras la germinación de las esporas, se extiende un tubo hifal y se liberan proteasas, quitinasas y lipidasas. Primero se liberan proteasas, lo que sugiere que las fibrillas de quitina están recubiertas de proteína, seguidas de la liberación de quitinasas. Se cree que la acción enzimática de *B. bassiana* ayuda a que el hongo se adhiera a la cutícula del insecto (Chiriboga , et al., 2015).

Las hifas utilizan presión mecánica (ejerciendo fuerza en un área concentrada) y enzimas para penetrar la cutícula y entrar en el hemocele. Si el insecto está en proceso de muda, puede descartar el exoesqueleto antes de que *B. bassiana* pueda penetrar en el nuevo tegumento, escapando así de la infección. La infección puede aparecer como manchas de color marrón oscuro en la cutícula del insecto, ya que la melanización puede ser parte de la respuesta inmune del insecto (Chiriboga , et al., 2015).

8.2.8. Morfología de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana tiene un crecimiento a manera de algodón blanco en sus etapas iniciales, donde se torna color amarillento o rosa pálido, con el transcurso del tiempo toma una forma polvoriento y de color crema generado por las esporas, donde el reverso es de color blanco amarillento. Es considerado como un hongo imperfecto, que cuenta con hifas septadas con estructuras reproductivas denominadas conidios (Contreras, 2019).

Por otra parte, el micelio es de color blanco y textura polvosa conidióforos simples, irregularmente agrupados o en racimos verticilados; en algunas especies inflado en la base, disminuyendo a una porción más fina y fértil que aparece en zigzag después de varias conidias se produce; conidios (simoduloesporas) hialinas, redondeadas, unicelulares, secas, que nacen solas en pequeños dentículos; parásito de insectos (Ronquillo, 2021).

8.2.9. Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas tienen como objetivo eliminar plagas mediante control biológico y están elaborados a base de bacterias, hongos, virus o nematodos (Ximhai et al., 2012). El control biológico puede surgir en forma natural, cuando dichos enemigos naturales de una plaga limitan su reproducción o desarrollo sin intervención humana. También puede ser un control aplicado, consecuencia de una selección y manipulación sobre bases científicas de esos enemigos naturales (Cabrera et al., 2012).

Los bioplaguicidas más utilizados son los organismos vivos, que son patógenos para la plaga de interés. Estos incluyen biofungicidas (*Trichoderma* sp.), bioherbicidas (*Phytophthora* sp.) y bioinsecticidas (*Bacillus thuringiensis*). Estos tipos de bioplaguicidas han sido de gran interés, debido a las ventajas aportadas por estos, dentro de las que se incluyen: (i) ser menos perjudicial al ambiente, debido a la baja carga ambiental producida, (ii) son diseñados para que solo una plaga en específico sea afectada, y (iii) usualmente se descomponen rápidamente y son efectivos en dosis bajas (Mazid et al., 2011).

Los bioplaguicidas se suelen clasificar en tres grandes categorías, las cuales se describen a continuación:

- Plaguicidas microbianos, aquellos que contienen un microorganismo (bacteria, hongo, virus, protozoos o algas) como ingrediente activo. Los plaguicidas microbianos pueden controlar diferentes tipos de plagas, aunque cuentan con ingredientes activos para objetivos específicos (Dutta, 2015).
- Protectores incorporados a la planta, son sustancias pesticidas que las plantas producen a partir de material genético que se ha agregado a la planta. Un ejemplo es cuando los científicos toman el gen para la proteína pesticida Bt e introducirlo en el material genético propio de las plantas. Luego la planta, fabricará la sustancia que destruye la plaga (Dutta, 2015).
- Pesticidas bioquímicos, son sustancias naturales, como extractos de plantas, ácidos grasos o feromonas que controlan las plagas mediante mecanismos no tóxicos. Incluyen sustancias que interfieren con el crecimiento o apareamiento, como los reguladores del crecimiento de las plantas (Dutta, 2015).

8.2.10. Actividad Biocontroladora

Las estrategias alternativas, como el uso de microorganismos antagonistas, ofrecen el potencial de proporcionar una protección sostenible y a largo plazo de los cultivos. La aplicación de agentes en control biológico (BCA) se considera una alternativa segura y respetuosa con el medio ambiente a los fungicidas sintéticos. Entre los microorganismos del suelo, las levaduras han recibido poca atención como agentes de control biológico de patógenos fúngicos transmitidos por el suelo en comparación con los antagonistas fúngicos bacterianos, actinomicetos y filamentosos. Las levaduras muestran mecanismos de acción similares contra los patógenos fúngicos de las plantas transmitidos por el suelo y los patógenos en partes aéreas

de las plantas. Su capacidad para multiplicarse rápidamente, producir metabolitos difusibles antifúngicos y enzimas degradantes de la pared celular (Di Francesco, et al., 2020).

Actualmente, las comunidades endófitas microbianas son el foco de varios estudios destinados a desentrañar y aclarar su papel como promotores del crecimiento vegetal y su participación en la sanidad vegetal. Se han identificado varias especies bacterianas diferentes que colonizan tejidos y vasos vegetales, desde el sistema de raíces hasta el tallo, las hojas y otros órganos de la planta. (Krishna, et al, 2018).

CAPÍTULO II

9. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

El aislado de *Beauveria bassiana* no controla gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en condiciones de laboratorio.

Hipótesis Alternativa

El aislado de *Beauveria bassiana* controla 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 2021 -2022.

Figura 3. Ubicación del Campus Salache



Fuente: Adaptado de (Google Earth)

Tabla 5. Ubicación geográfica del ensayo

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

Fuente: (Bermudez, 2022)

10.2. Tipo de Investigación:

10.2.1. Experimental

Por medio de la investigación experimental se da el control de las variables para determinar la relación existente entre ellas, por medio de una metodología de tipo científica (Acevedo, Linares , & Cachay, 2013). A través, de este tipo de investigación se realizó la recopilación de los datos de *Beauveria Bassiana* aislado del estiércol de conejo para control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), en condiciones de Laboratorio Campus Salache 2021 -2022, con el fin de comparar las mediciones de comportamiento de un grupo control, con las mediciones de un grupo experimental.

10.2.2. Cuantitativa

La investigación cuantitativa permite unificar y analizar los datos numéricos sobre variables previamente determinadas (Domínguez, 2007). Por medio de esta investigación se buscó la relación entre los elementos que han sido cuantificados y facilita la interpretación de los resultados.

10.3. Modalidad básica de investigación

10.3.1. De Laboratorio

La investigación es de laboratorio, ya que los registros de datos se los realizó en el lugar donde se estableció el experimento.

10.3.2. Bibliográfica Documental

Este tipo de investigación es un procedimiento científico, que consiste en indagar, recolectar, organizar y analizar e interpretar la información de un determinado tema, que permite la construcción de conocimientos (Rizo, 2015). Este estudio tiene relación con material bibliográfico y documental que servirá de base para el contexto del marco teórico y los resultados obtenidos.

10.4. Análisis estadístico

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

10.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

10.5.1. Observación de campo

Es una técnica que consiste en observar atentamente el fenómeno, hecho o caso, tomar información y registrarla para su posterior análisis. La observación es un elemento fundamental de todo proceso investigativo; en ella se apoya el investigador para obtener el mayor número de datos. Gran parte del acervo de conocimientos que constituye la ciencia ha sido lograda mediante la observación (Rizo, 2015). Al utilizar esta técnica se activó el sentido que ayudará en la recolección de datos, además, denotar cambios presentes en la práctica

10.6. Materiales

10.6.1. Materia Prima

- Estiércol de conejo (con presencia de micelios)
- Humus de Lombriz
- Turba
- Tierra

10.6.2. Reactivos

- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Agar Base
- Antibiótico (Gentamax 280mg)
- Azul de metileno

10.6.3. Materiales de Laboratorio

- Estuche de disección
- Parafilm
- Probeta
- Vasos de precipitación
- Cajas Petri
- Porta y cubre objetos

10.6.4. Materiales para el ensayo

- Larvas (*Phyllophaga spp.*)
- Botellas de 5 litros
- Chisquete grande
- Funda Plástica

10.7. Equipos

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

10.8. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar DBCA con un arreglo factorial $A \times B + 1$, obteniendo siete tratamientos con cinco repeticiones, empleándose 15 larvas

por tratamiento mismos que estuvieran distribuidos en tres concentraciones y el testigo sin aplicación.

Tabla 6. Esquema del Adeva

Factor de Variación	Grados de libertad
FACTOR A	2
FACTOR B	1
FACTOR A*FACTOR B	2
REPETICIONES	4
Error	28
Total	34

Fuente: (Bermudez, 2022)

10.8.1. Factor en estudio

A: Concentración de conidios

- A1 = 10^4
- A2 = 10^6
- A3 = 10^8

B: Tipos de Aplicación

- B1 = Inmersión
- B2 = Aspersión

Tabla 7. Tratamientos en estudio

Tratamientos	Códigos	Descripción
---------------------	----------------	--------------------

T1	A1B1	10 ⁴ conidias mL-1 / inmersión
T2	A1B2	10 ⁴ conidias mL-1 / aspersión
T3	A2B1	10 ⁶ conidias mL-1 / inmersión
T4	A2B2	10 ⁶ conidias mL-1 / aspersión
T5	A3B1	10 ⁸ conidias mL-1 / inmersión
T6	A3B2	10 ⁸ conidias mL-1 / aspersión
T7	A0B0	Sin Aplicación

Fuente: (Bermudez, 2022)

10.9. Operacionalización de Variables

El siguiente cuadro presenta las variables a evaluar:

Tabla 8. Variables e indicadores

Tipo de Variable	Nombre	Indicador	Índice
Dependiente	Mortalidad	Mortalidad de gallina ciega (<i>Phyllophaga spp.</i>)	Porcentaje de mortalidad de larva (tercer estadio)
Independiente	<i>Beauveria bassiana</i>	Concentración de conidios 10 ⁴ , 10 ⁶ , 10 ⁸	Suspensión de 10 ml por unidad experimental

Fuente: (Bermudez, 2022)

10.11. Metodología del aislamiento

10.11.1. Procedencia de las muestras experimentales

Las muestras se recolectaron a los 15 días del estiércol de los conejos que tenían presencia de micelios. Su recolección se la realizó en la parroquia Juan Montalvo, barrio América, cantón Cayambe. Posteriormente, las muestras se trasladaron a los laboratorios del campus de Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

10.12.2. Preparación de medio de cultivo

Se empleó la metodología utilizada por (Gómez, Zapata, Torres, & Tenorio, 2014), para la preparación del medio de cultivo PDA, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se pesó 15,6 gr en una balanza analítica, sólido que fue vertido en una botella esterilizadora con 400 ml de agua destilada disolución que abastece para 20 cajas Petri (actividad que se ejecutó 2 veces por semana durante 1 mes).
- 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 40 min.
- Al terminar el tiempo de esterilización se agregó el antibiótico, que consistió en la aplicación de una ampolla de Gentamax, 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 se repartió en cajas Petri estériles y se dejó en reposo para que solidifique.

10.13.3. Aislamiento

- Las muestras de estiércol de conejo con mayor porcentaje de micelios fueron colocadas con ayuda de unas pinzas en las cajas Petri, las cuales fueron selladas con Parafilm y cubiertas con plástico, actividad que se ejecutó en la cámara de flujo laminar.

10.14.4. Incubación

- Para la incubación se utilizó una incubadora, para alcanzar y mantener las temperaturas del medio de cultivo de 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.

10.14.5. Purificación

- Se obtuvo una pequeña cantidad de masa del hongo separada en el aislamiento. Con ella se inoculó un nuevo medio de cultivo. La incubación en condiciones adecuadas proporcionó un cultivo puro. Proceso que se repitió hasta obtener 100 cajas Petri purificadas.

10.14.6. Identificación

Azul de metileno o Lugol

- Las cepas aisladas fueron microscópicamente caracterizadas a través de la tinción simple. Para la tinción simple se cubrió la extensión debidamente preparada con azul de metileno, al minuto se lavó con agua hasta eliminar el exceso de colorante dejando secar al ambiente y finalmente se observó en el microscopio.

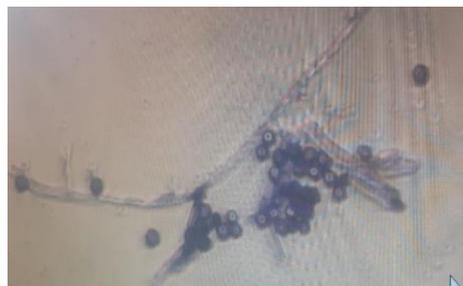
Cinta adhesiva

- Se tomaron las cajas Petri con el desarrollo de micelio para identificar el tipo de hongo que se desarrolló en el medio de cultivo, se retiró el Parafilm para abrir las cajas Petri y tomó el micelio desarrollado con una aguja de disección se raspó el micelio para colocarlo en un portaobjetos que contenga azul de metileno o Lugol y cubrir con un cubreobjetos.

Al tener el micelio en un portaobjetos se tomó y colocó debajo del lente microscópico para tener una vista que ayude a identificar el tipo de hongo que se encuentra en cada caja Petri.

Figura 4. Hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* aislado a partir de estiércol de conejo

(A) Micelio de *B. Bassiana* sobre medio de PDA (B) conidios y conidióforos de *B. Bassiana* (20x).



Fuente: (Bermudez, 2022)

10.14.7. Morfología

Figura (A): Micelio: De color blanco aterciopeladas, algodonosas, pulverulentas.

Figura (B): Conidios y conidióforos

Conidios: De contraste hialinos, redondeados o globosos, subglobosas unicelulares, con base apiculada de 2.5 – 4,5 μm .

Conidióforos: Células Conidióforas alargadas, solitarias, de base subglobosa o cilíndrica de 3 a 20 μm de largo por 1.3 a 4 μm de ancho, formando racimos compactado.

10.15. Cultivo monoespórico

El procedimiento se obtuvo de (Gómez, Zapata, Torres, & Tenorio, 2014) quien menciona que un aislamiento monoespórico es aquel que se obtiene a partir de una espora con un contenido genómico único, que corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula individual, con la finalidad de minimizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos en producción.

10.15.1. Esterilización

- Se colocó en el autoclave las pinzas, tijeras, punta de pipetas amarillas envueltas en papel aluminio.

10.15.2. Preparación de medio de cultivo Agar agua (AA)

- Se pesó 0,5 gr de agar en una balanza analítica, en una botella esterilizadora se colocó 50 ml de agua destilada previamente desinfectada y se vertió el sólido, se agitó la botella de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea, terminado este proceso se llevó al autoclave para ser esterilizado a 35 °C por 40 min.

10.15.3. Cosecha de micelios

- Se extrajo dos cajas Petri de la incubadora con presencia de micelios, en la cámara de flujo laminar con ayuda de una asa bacteriológica y agua destilada se raspó los micelios presentes en las cajas.
- Se agitó la solución durante 10 segundos para que se desprendan las partículas.

10.15.4. Cámara laminar

- Se encendió el mechero en la cámara laminar para evitar contaminación durante la actividad que se realizó y colocó todos los insumos de trabajo (2 micropipetas de 100 μL 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 μL se tomó el agua destilada y colocó en el tubo eppendorf repetir este proceso 4 veces hasta obtener 800 μL en los 2 tubos eppendorf.
- Para realizar la segunda disolución, se tomó 100 μL de la solución madre y agregó 90 μL de agua destilada, se cambió la pipeta de punta amarilla y con la misma micropipeta 100 μL se colocó la solución que contiene el hongo, contenido de 1 ml en cada eppendorf.

10.15.5. Solución pura

- Con una micropipeta de 200 μL se colocó en un tubo eppendorf la solución que contiene el hongo y agitó en un vòrtex por 10 segundos.
- Se sembró los 10 μL o 1 ml contenidas de los tubos eppendorf en las cajas Petri y se distribuyó hasta cumplir toda la caja. Se colocó en la incubadora durante 24 horas a 26 $^{\circ}\text{C}$.
- Con ayuda de un microscopio se ubicó una espora germinada y se señaló con una asa microbiológica y marcador en el reverso de la placa.
- En la cámara de flujo laminar se cortó con una hoja de bisturí estéril el bloque de agar que contiene la espora y se transfirió a un medio de cultivo PDA con antibiótico, se llevó a incubar a 26 $^{\circ}\text{C}$ por 8 a 10 días, al cabo de este tiempo se seleccionaron las colonias monospóricas sin contaminantes y que presenten las características típicas del hongo sembrado.

10.16. Conteo de colonias

- Se utilizó la metodología de (Chiriboga , Gómez, & Garcés , 2015) para el conteo de colonias, el cual se detalla a continuación:
- Se retiró de la incubadora las cajas Petri con medio de cultivo PDA que es donde se desarrolla *Beauveria bassiana*.
- Con un asa microbiológica se raspó la parte de micelios que contiene las cajas Petri (2 cajas) esta suspensión se llenó 100 ml de agua destilada en una probeta.

- Se agitó en un vórtex hasta que la muestra se disperse completamente.
- La suspensión obtenida corresponde a la solución madre.

10.16.1. Preparación de disoluciones seriadas

- Se tomó 1ml con una micropipeta de la solución madre y se colocó en cuatro tubos de ensayo 9 ml de agua destilada.
- Se agitó en un vórtex hasta que la muestra. Se replicó 4 veces el proceso anteriormente mencionado hasta llegar a la concentración 108.

10.16.2. Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en la cámara Neubauer)

- Con una micropipeta de 100 μL se extrajo la solución de la muestra 104. Se transfirió la muestra a la cámara Neubauer, hasta que por capilaridad se llene un lado de la cámara. Se llevó la cámara al microscopio y se observó con el lente 40X para esta actividad se ubicó en el primer cuadrante (superior derecho). Se cuantificó los conidios presentes en el cuadrante central, como se indica en la figura.

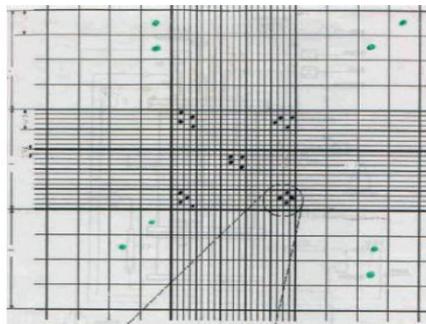


Figura 5. Cámara de Neubauer

El resultado se obtuvo con la aplicación de la siguiente fórmula ajustada de Gómez, et al, (2014):

$$\text{UFC} = \bar{x} * 10000 * \text{FD}$$

Donde:

\bar{x} : Promedio de las lecturas por área de conteo.

FD: Factor de disolución.

10 000: constante del cuadrante central

10.17. Colecta de larvas (*Phyllophaga* spp.)

Se colectaron larvas activas de tercer estadio de *Phyllophaga* spp. las cuales se depositaron en recipientes plásticos, mismos que contienen una cantidad considerable de turba y tierra como alimentación para ser trasladadas al laboratorio del campus Salache.

10.18. Implementación del ensayo

Se siguió el procedimiento de Medina, et al., (2012) con algunas modificaciones:

Las larvas colectadas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y luego se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril, antes de secarlas en papel toalla estéril. Se escogieron 510 larvas activas y se colocarán en 34 recipientes plásticos estériles mismos que contenían 15 larvas de *Phyllophaga* spp. cada uno a una profundidad de 20 cm.

De las cajas Petri multiplicadas de *Beauveria bassiana*, se raspó con una aza previamente desinfectada con agua destilada, esta solución fue colocada en una probeta de 100 ml con agua destilada. La suspensión resultante se agitó por 6 minutos en un vórtex para desprender los conidios. A partir de la solución madre se prepararon diluciones en serie con un factor de dilución 0.1, para obtener: 104, 106 y 108 conidias mL⁻¹ a las que se identificó como T1-T2, T3-T4 y T5-T6, respectivamente.

10.18.1. Exposición de las larvas al hongo

Consistió en la inoculación de la larva con la cepa de hongo reactivada. Se utilizaron dos métodos de exposición:

10.18.2. Inmersión

- Las larvas correspondientes a cada concentración (104, 106 y 108) se colocaron en un recipiente plástico que contenían 10 ml de solución de *Beauveria bassiana* para posteriormente ser sumergidas por 2 min.
- Después de su inoculación, las larvas fueron colocadas en un lugar fresco donde se da seguimiento a la investigación.

10.18.3. Aspersión

- Se colocaron las larvas en un recipiente para ser asperjadas con la suspensión del hongo.
- Después, las larvas se colocaron en los recipientes de plástico correspondiente a cada código de identificación por tratamiento.

10.19. Evaluación del ensayo

La aplicación de las diferentes concentraciones de conidios se ejecutó cada 8 días, registrándose datos de mortalidad de las larvas todos los 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:

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

Para confirmar el agente causal, los insectos muertos se colocaron en la incubadora con medio de cultivo hasta la emergencia del hongo.

Figura 6. Esporulación de *B. bassiana* en gallina ciega



Fuente: (Bermudez, 2022)

CAPÍTULO III

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie de *Beauveria* se identificó mediante un análisis, realizado en el laboratorio BIONIKA ubicado en la ciudad de Quito, en donde se obtuvo la taxonomía fungal a nivel de género y especie con los siguientes resultados:

Tabla 9. *Ubicación taxonómica de Beauveria bassiana*

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

Fuente: (Alexopoulos, 1979)

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 de crecimiento de las colonias son color blanco, posteriormente de color amarillo pálido, que evidencia la producción de metabolitos.

Conidioforos: Sencillos, irregulares, 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, redondos o globosos unicelulares, con base apiculada de 2.5-4,5 μm . El raquis de 25 μm .

GERMINACIÓN

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

METABOLITOS SECUNDARIOS

Beauvericina, Bassianolides, Enniantinas A y B, Beauverolidos, Bassianinas, Tenelinas, oosporeinas, ácidos oxálicos, oxalatos de calcio.

ENZIMAS DETECTADAS

Proteasas, Lipasas, Aminopeptidadasas, estererasas, quitinasa.

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

Para la tabulación de los datos analizados en el programa InfoStat, se utilizó la fórmula de Poisson $\sqrt{x+0,5}$, misma que fue adaptada de (Banzatto & Kronka, 2006) quienes mencionan que esta operación se utilizaba cuando se producen valores bajos como es el caso del testigo.

Tabla 10. Análisis de Varianza del Porcentaje de Mortalidad

CV%		8,24				
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	41,39	9	4,6	12,88	<0,0001	
TRAT	253,89	6	42,31	136,31	<0,0001	**
FACTOR A	35,76	2	17,88	50,08	<0,0001	**
FACTOR B	2,31	1	2,31	6,48	0,0193	NS
FACTOR A*FACTOR B	1,77	2	0,89	2,48	0,1088	NS
REPETICIONES	1,55	4	0,39	1,09	0,3865	
Error	7,14	28	0,31			
Total	48,53	34				

Fuente: (Bermudez, 2022)

En la tabla 10, se detalla el porcentaje de mortalidad, donde el ADEVA indica que a los 35 días el Factor A (concentración de conidios) es altamente significativo a diferencia del Factor B (tipos de aplicación), con respecto a las interacciones entre factores no existe significancia, obteniendo un coeficiente de variación de 8,24.

Tabla 11. Contrastes Ortogonales testigo vs tratamientos

Contrastes							
TRATAMIENTOS	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste1	-42,4	1,61	214,04	1	214,04	689,5	<0,0001 **
Total			214,04	1	214,04	689,5	<0,0001

Fuente: (Bermudez, 2022)

Para la comparación ortogonal CO1 (T7 vs T1, T2, T3, T4, T5, T6) se detectó alta significancia estadística lo que explica que en los diferentes tratamientos hubo un correcto control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) a diferencia del testigo, en el cual no se realizó la inoculación de *Beauveria bassiana*.

Tabla 12. Contraste del Factor A

FACTOR A	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
	Contraste1	-3,24	0,47	17,48	1	17,48	49,38	<0,0001 **
	Contraste2	-1,91	0,27	18,28	1	18,28	73,4	<0,0001 **
	Total		35,76	2	17,88	61,39	<0,0001	FACTOR C1.1 C1.2
								A
								C10(4) 2 0
								C10(6) -1 1
								C10(8) -1 -1

Fuente: (Bermudez, 2022)

En la tabla 12, se evidencia el contraste 1 y 2, donde se manifestó alta significancia estadística lo que explica que el comportamiento de cada concentración es diferente. También se observó que el contraste 1 está compuesto por la comparación de la concentración 10^4 frente 10^6 y 10^8 , el contraste 2 se analizó frente a 10^6 y 10^8

Tabla 13. Prueba de Tukey para el Factor A

FACTOR A	Medias	n	E.E.	Rangos
C10(8)	9,27	10	0,19	A
C10(6)	7,36	10	0,19	B
C10(4)	6,69	10	0,19	B

Fuente: (Bermudez, 2022)

Figura 7. Prueba de Tukey para el Factor A



Fuente: (Bermudez, 2022)

De acuerdo a los grupos de significancia en el Factor A (concentraciones de conidios) se ubican en dos rangos de significancia, la concentración 10^8 con una media de 9,27 en el rango A, y en las concentraciones 10^6 , 10^4 en el grupo B con unas medias de 7,36 y 6,69 respectivamente.

Tabla 14. Contraste del Factor B

FACTOR B	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste1	-0,56	0,22	2,31	1	2,31	6,38	0,0185 NS
Total			2,31	1	2,31	6,38	0,0185

FACTOR B	Ct.1
Aspersión	1
Inmersión	-1

Fuente: (Bermudez, 2022)

En el contraste del Factor B se puede observar que no existe diferencias significativas en el tipo de aplicación (inmersión y aspersión), el cual tiene los siguientes resultados 1 y -1 respectivamente.

Tabla 15. Prueba de Tukey para el Factor B

FACTOR B	Medias	n	E.E.	
Inmersión	8,05	15	0,16	A
Aspersión	7,5	15	0,16	B

Fuente: (Bermudez, 2022)

Figura 8. Prueba de Tukey para el Factor B



Fuente: (Bermudez, 2022)

En el factor B se agrupan en dos rangos el tipo de aplicación inmersión en el grupo A con una media de 8,05 y en la categoría B por aspersión con 7,5 de media.

Tabla 16. Contraste Fator A*B

FACTOR A*FACTOR B	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste1	-7,4	1,47	9,12	1	9,12	25,19	<0,0001 **

Contraste2	-5,86	1,2	8,59	1	8,59	23,72	0,0001	*
Contraste3	-4,07	0,93	6,91	1	6,91	19,07	0,0002	NS
Contraste4	-3,7	0,66	11,41	1	11,41	31,51	<0,0001	**
Contraste5	-1,23	0,38	3,81	1	3,81	10,52	0,0035	NS
Total			39,84	5	7,97	22	<0,0001	

Fuente: (Bermudez, 2022)

En la tabla 16, se realizaron las comparaciones entre las distintas interacciones por el factor A y B donde se observaron diferencias significativas, altamente significativas para el contraste 1 y 4, diferencias significativas para el contraste 2 y diferencias no significativas para los contrastes 3 y 5 lo que manifiesta que los resultados en el control de gallina ciega fueron diferentes.

Tabla17. Prueba de Tukey para el Factor B

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	Rangos
C10(8)	Inmersión	9,89	5	0,27	A
C10(8)	Aspersión	8,65	5	0,27	B
C10(6)	Inmersión	7,42	5	0,27	C
C10(6)	Aspersión	7,3	5	0,27	C
C10(4)	Inmersión	6,85	5	0,27	C
C10(4)	Aspersión	6,54	5	0,27	C

Fuente: (Bermudez, 2022)

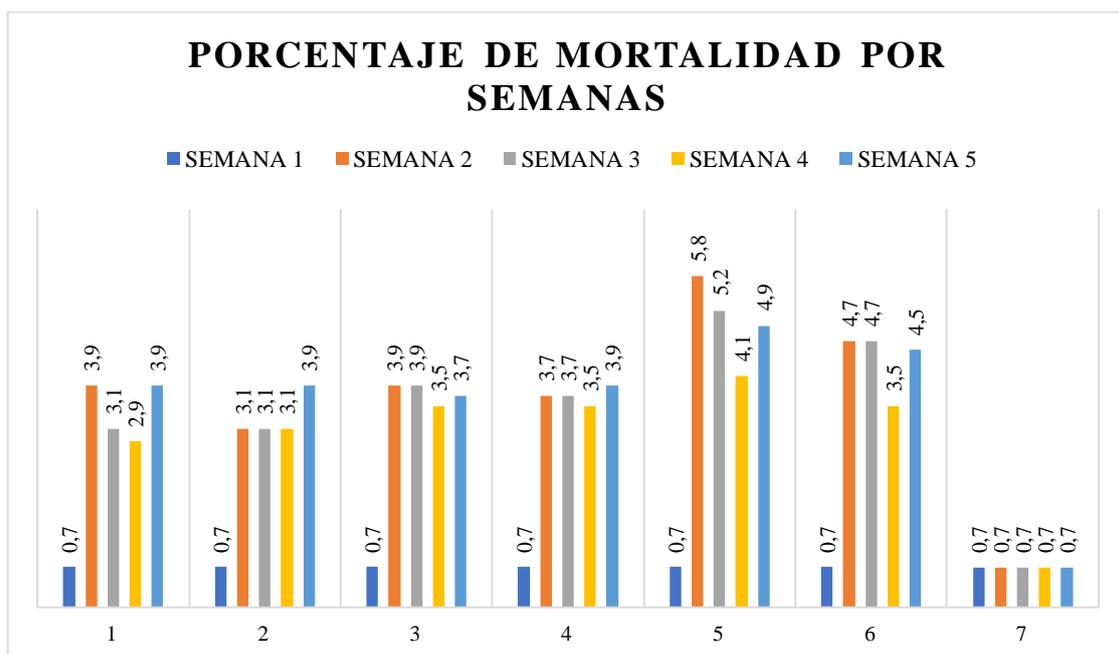
Figura 9. Prueba de Tukey para el Factor A*B



Fuente: (Bermudez, 2022)

En la tabla 17, se evidencia el grupo de Significancia del Factor A y B presento los siguientes datos, la concentración 10^8 inmersión en la categoría A con una media de 6,85 y aspersión se sitúa en el rango B con una media de 6,54 ,la concentración 10^6 por inmersión y aspersión corresponden a 7,42 y 7,3 de media respectivamente, mientras que las concentraciones 10^6 por inmersión y aspersión tiene una media de 7,42 y 7,3 respectivamente ubicándose las concentraciones anteriormente mencionadas en la categoría C.

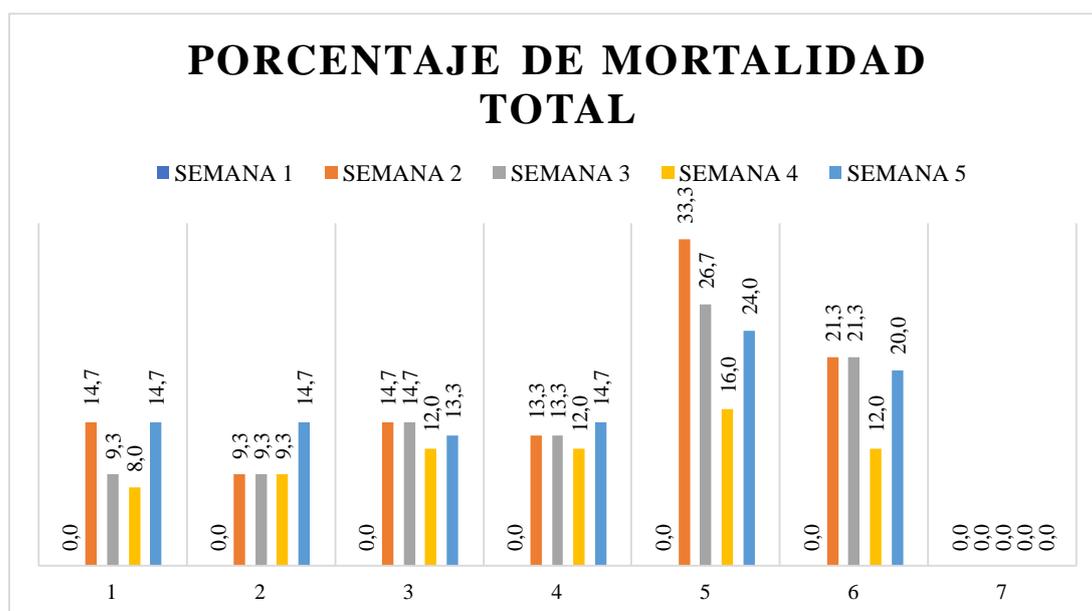
Figura 10. Porcentaje de Mortalidad por semanas utilizando la fórmula de Poisson



Fuente: (Bermudez, 2022)

Para la tabulación de los valores reflejados en la figura 6 se utilizó la fórmula de Poisson $\sqrt{x+0,5}$, misma que fue adaptada de (Banzatto & Kronka, 2006) quienes mencionan que esta operación se utiliza para valores atípicos como es el caso del testigo en esta investigación correspondiente al tratamiento 7. El porcentaje de mortalidad se observó durante 35 días, es decir 5 semanas de estudio evidenciándose un mayor número de mortalidad de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en el tratamiento 5 con una concentración de 10^8 mediante el tipo de aplicación por inmersión, seguido del tratamiento 6 con la misma concentración por el método de aplicación aspersion.

Figura 11. Porcentaje de Mortalidad por semanas



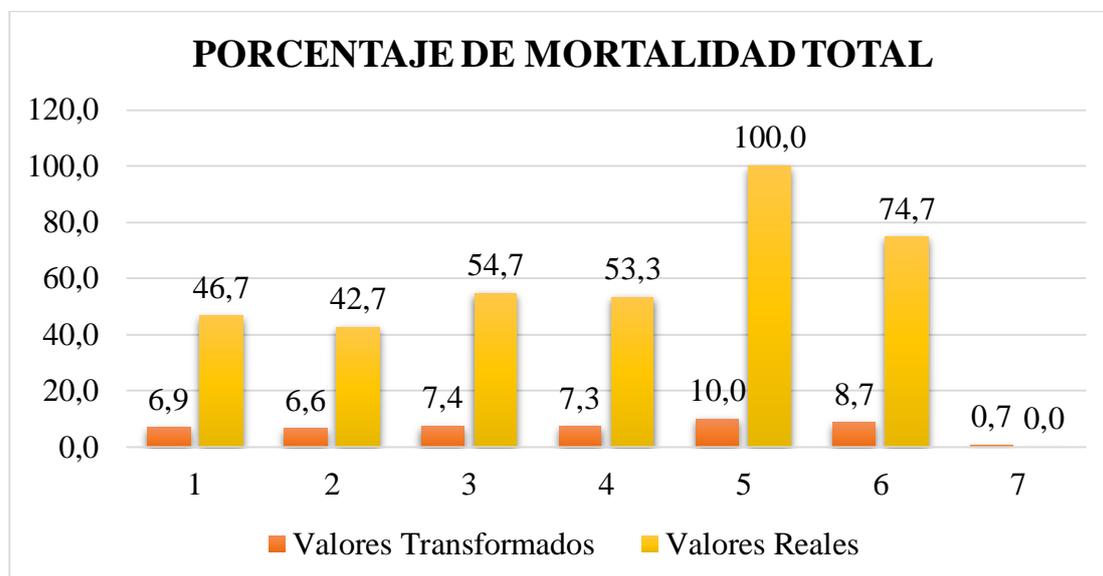
Fuente: (Bermudez, 2022)

En la figura 11, para el porcentaje de mortalidad se observó durante 35 días, es decir 5 semanas de estudio evidenciándose un mayor número de mortalidad de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en el tratamiento 5 con una concentración de 10^8 mediante el tipo de aplicación por inmersión, correspondiente a 33,3%, seguido del tratamiento 6 con la misma concentración por el método de aplicación aspersion con 21,3 %, mientras que en la concentración 10^6 existe un control de 14,7 % de las larvas en cuanto a la dos formas de

aplicación como valor más alto durante los 35 días y en la concentración 10^4 su mortalidad se mantuvo entre el 9,3 y 14,7 % en la última semana, esto se puede atribuir a la producción de metabolitos de bajo peso molecular por *Beauveria bassiana* (Chávez, et al., 2014).

La mortalidad de (*Phyllophaga spp.*), se registraron durante cinco semanas, donde se observaron larvas muertas a partir de la segunda semana presentando diferentes anomalías como perdidas de coordinación, cambio de color en la cutícula, asemejándose con lo mencionado por (Rivas, 2020) quien observo disturbios a nivel nervios, pérdida de alimentación y muerte del insecto.

Figura 12. Porcentaje de Mortalidad



Fuente: (Bermudez, 2022)

En la figura 12, muestra el porcentaje de mortalidad de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), evidenciándose dos tipos de barras dadas por color amarillo a los valores reales del experimento, mientras que la barra de color anaranjado hace referencia a los datos transformados con la fórmula de Poisson $\sqrt{x+0,5}$, misma que fue adaptada de (Banzatto & Kronka, 2006) quienes mencionan que esta operación se utilizada cuando se producen ceros o valores bajos como se puede observar en la gráfica la tendencia sigue siendo la misma.

En la misma gráfica se observa que el tratamiento 5 obtuvo mayor porcentaje de mortalidad alcanzando un 100% en control de gallina ciega. Este resultado es similar con el estudio realizado por Flores y Rivas, (2020) quienes determinaron el control biológico de *Beauveria*

bassiana sobre el insecto *Planococcus citri* en condiciones *in vitro*. Determinaron la muerte del insecto por medio de la eficiencia con valores que oscilan entre un 80% y un 95%, en tratamientos que se diferencian entre la concentración, tiempo de inmersión y el uso de un coadyuvante.,

El tratamiento 6 correspondiente a la concentración 10^8 por aspersión con 74,7 % de larvas muerta mientras que los tratamientos 10^4 y 10^6 conidios/ml causaron una mortalidad acumulada entre 40 y 50 % en el día 35. Por el contrario, para el testigo no se presentó porcentaje de mortalidad. Lo que contrasta con Jaramillo (2019) quien evaluó alrededor de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* y su eficacia contra el picudo negro del plátano, utilizando concentraciones de 1×10^7 esporas por cada mililitro de solución con 46% de porcentaje en mortalidad valor más alta en su control, resultados diferentes a los obtenidos en la presente investigación debido a que el picudo negro del plátano es más resistente que la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*).

Por otra parte, estos resultados contrastan con los obtenidos por Morales, et al., (2014) quienes evaluaron un formulado de aceite vegetal que contenía *Beauveria bassiana* en el control de la broca que afecta al café. Determinaron que los porcentajes de mortalidad oscilan entre el 90%-100%, demostrando una alta eficiencia.

Una vez realizado el análisis estadístico de los resultados se obtuvo que el factor A que corresponde a la concentración de conidios presenta resultados con mayores diferencias significativas, a diferencia del factor B que corresponde a los tipos de aplicación. Esto indica que el factor A (concentración de conidios) influye directamente en la muerte de la gallina ciega (*Phyllophaga spp.*). Este resultado concuerda con Carballo, et al., (2019) quienes evaluaron *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile. Con diferentes concentraciones de conidios del hongo entomopatógeno como el uso del coadyuvante, definiendo que mayores índices de mortalidad se presentan al modificar la concentración.

De igual forma, estos resultados estadísticos contrastan con los obtenidos por Morales, et al., (2014) evaluaron distintos tipos de concentración de conidios y distintos sustratos. Los sustratos no inciden de forma directa en los resultados de actividad biocontroladora, mientras que sí afecta de forma directa la concentración de los conidios del hongo entomopatógeno.

CAPÍTULO IV

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

- Se identificó mediante análisis taxonómico que el aislado obtenido de estiércol de conejo es *Beauveria bassiana*.
- Se estableció que *Beauveria bassiana* a partir de estiércol de conejo controla gallina ciega.
- Se determinó que la concentración 10^8 en inmersión de *Beauveria bassiana* controló el 100% de individuos de gallina ciega, seguido por 10^8 por aspersión con 74,4% de individuos muertos.
- Se comprobó que las larvas de gallina ciega muertas presentaron *Beauveria bassiana* en la cutícula.

Recomendaciones:

- Realizar estudios de biocontroladores a base de *Beauveria bassiana* con concentraciones más altas, probando diferentes condiciones ambientales y sustratos.
- Utilizar diferentes hongos entomopatógenos como actividad biocontroladora para control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*), para adquirir mayores agentes de manejo.

- Aislar *Beauveria bassiana* en diferentes lugares utilizando estiércol de conejo, con el objetivo de poder determinar diferentes especies y recomendar a los agricultores agentes biológicos que estén al alcance de pequeños y medianos productores.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, A., Linares , C., & Cachay, O. (2013). INVESTIGACIÓN EN LA ACCIÓN. UN EJEMPLO DE ESTUDIO EXPERIMENTAL EN EL MERCADEO DE SERVICIOS. *Redalyc*, 16(2), 79-85. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/816/81632390010.pdf>
- Afandhi, A., Widjayanti, T., Apri, A., Tarno, H., Afiyandi, M., Novita, R., & Handoko, S. (2019). Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Springer Link*, 11(2). Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1186/s40538-019-0148-1>
- Altamirano, M. (2016). *Evaluación de insecticidas biológicos botánicos y químicos para el control de Phyllophaga spp. en el cultivo de repollo (Brassica oleracea L), Miraflor, Esteli, Nicaragua*. Universidad Nacional Agraria , Maganagua. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/1913/1/tnh10a465.pdf>
- Arguello, H. (2019). Aspectos bioecológicos y de manejo de gallina ciega (*Phyllophaga* sp.), en la producción de cacao (*Theobroma cacao*) en Río San Juan, Nicaragua. *Scielo*, 2(2), 55-78. Obtenido de <https://lacialera.una.edu.ni/index.php/CALERA/article/view/305/345>
- Ayodeji, A., Prashant, B., Ashok, P., Suren, S., & Santosh, P. (2020). Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Taylor Francis Online*, 40(7), 1019-1034. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388551.2020.1805403?scroll=top&needAccess=true>
- Banzatto, D., & Kronka, S. (2006). Experimentação agrícola. Brasil.

- Barra, L., France , A., Gernding, M., Silva, G., Carrasco, J., Franco, J., & Ortiz, J. (2020). Antifungal Activity of *Beauveria bassiana* Endophyte against *Botrytis cinerea* in Two Solanaceae Crops. *Microorganisms*, 8(65), 1-15. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/1/65>
- Barra, L., Gerding, M., Francia , A., Silva , G., Guerra, M., & Vergara, P. (2020). *Beauveria bassiana* multifunción como endófito: promoción del crecimiento y control biológico de *Trialeurodes vaporariorum* , (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en tomate. *Insects*, 11(1), 1-15. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/9/591>
- Carballo, M., Rodríguez, L., & Durán, J. (2019). Evaluacin de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas*(62), 54-59.
- Chiriboga , H., Gómez, G., & Garcés , K. (2015). *BEAUVERIA BASSIANA, HONGO ENTOMOPATÓGENO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGAS CORTADORAS (YSAÚ)*. Obtenido de <http://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=1E7D82A717ED44F8BC9C567E29B91EAE?sequence=1>
- Contreras, C. (2019). *Evaluación de la percepción de los agricultores maiceros sobre los daños*. Universidad Técnica estatal de Quevedo, Quevedo. Obtenido de <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3628/1/T-UTEQ-0164.pdf>
- Da Silva , R., Vargs, J., Sánchez, J., Oliva, R., Alarcón , T., & Villegas, P. (2020). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as compatible and efficient controllers of plague insects in aquaponic crops. *Scientia Agropecuaria*, 11(3). Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172020000300419&script=sci_arttext
- Del Puerto, A., Suárez, s., & Palacio, D. (2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010
- Di Francesco, A., Di Foggia, M., Corbetta, M., Baldo, D., Ratti, C., & Baraldi, E. (2020). Biocontrol Activity and Plant Growth Promotion Exerted by *Aureobasidium pullulans*

- Strains. *SpringerLink*, 40(2), 1233-1244. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-020-10184-3>
- Domínguez, Y. (2007). El análisis de información y las investigaciones cuantitativa y cualitativa. *Revista Cubana de Salud Pública*, 33(3). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662007000300020
- FAO. (2016). *Aumenta la importación de agroquímicos en Ecuador*. Obtenido de <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/510025/>
- Flores, B., & Rivas, V. (2020). *EFECTO DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL HONGO Beauveria bassiana SOBRE EL INSECTO Planococcus citri, EN CONDICION IN VITRO - REGIÓN LAMBAYEQUE, 2020*. Universidad de Lambayeque, Lambayeque. Obtenido de <https://repositorio.udl.edu.pe/handle/UDL/419>
- Fuentes, J. (2019). *Manejo Integrado del Orozco café (Coffea arabica) (Phyllophaga spp.) en el cultivo de " en la Hacienda Chojampe, Cantón Ventanas*. Universidad Técnica de Babahoyo , Babahoyo. Obtenido de <chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Ffdspace.utb.edu.ec%2Fbitstream%2Fhandle%2F49000%2F7950%2FE-UTB-FACIAG-ING%2520AGRON-000211.pdf%3Fsequence%3D2%26isAllowed%3Dy&cIen=266899>
- 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-Usode-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>
- INEC. (2014). *Uso y manejo de agroquímicos en la agricultura 2014*. Obtenido de https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2014/Modulo_Uso_y_Manejo_de_Agroquimicos.pdf
- Intagri. (2019). *Beauveria bassiana en el Control Biológico de Patógenos*. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>

- Jaramillo, J. (2019). *Evaluación de cuatro cepas de Beauveria bassiana producidas en dos medios diferentes y su eficacia en el control sobre adultos de Cosmopolites sordidus (Picudo negro del plátano)*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.
- Krishna, S., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of Streptomyces spp. as Endophytes. *PubMed*, 19(4), 952-960. Obtenido de <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/952/htm>
- Mamani, Y. (2021). *EVALUACIÓN DE TRES CEPAS DE (CONTROL BIOLÓGICO DE (Beauveria bassiana Eloria noyesi A.) PARA EL S.) DEL CULTIVO DE COCA (Erythroxylum coca L.) EN CONDICIONES DE LABORATORIO EN LA COMUNIDAD DE EL COLPAR SUD YUNGAS DE LA PAZ*. Universidad Mayor de San Andrés , La Paz. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/25925>
- Medina , A., González, A., Pineda, J., & Hernández, A. (2012). Incidencia, caracterización cultural y prueba de patogenicidad de Ceratobasidium sp. aislado de manchas bandeadas en maíz. *Bioagro*, 24(3), 13-27.
- Morales, A., Jarquin , R., Gómez, J., Díaz, O., & Marín, J. (2014). Evaluación de un formulado de aceite vegetal de Beauveria bassiana en condiciones de laboratorio para el control de la broca del café. *FITOSANIDAD*, 18(1), 5-14.
- Morocho, N., Mazón, M., & Ruiz, J. (2020). Presencia dePhyllophagaspp. (Coleoptera: Scarabaeidae) y hongosentomopatógenos potenciales para su control biológico en sistemas agrícolasde Saraguro (Loja, Ecuador). *CEDAMAZ Revista del Centro de Estudio y Desarrollo de la Amazonia*, 10(2), 51-56. Obtenido de <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/896/762>
- Portillo, G. (2017). *Gallina ciega: síntomas y tratamiento*. Obtenido de <https://www.jardineriaon.com/gallina-ciega-sintomas-y-tratamiento.html>
- Puentes, W. (2015). *LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL Y EL DETERIORO DE LOS RECURSOS NATURALES EN EL ECUADOR. UNA PERSPECTIVA DESDE LA GEOGRAFÍA*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador , Quito. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8665/LA%20PROBLEMA%20%81TICA%20AMBIENTAL%20Y%20EL%20DETERIORO%20DE%20R.N.%20E>

N%20EL%20ECUADOR.%20UNA%20PERSPECTIVA%20DESDE%20LA%20GEOGRAFIA.pdf?sequence=1

- Rivas, V. (2020). *EFECTO DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL HONGO Beauveria bassiana SOBRE EL INSECTO Planococcus citri, EN CONDICION IN VITRO REGIÓN LAMBAYEQUE, 2020*. Universidad de Lambayeque, Chiclayo. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Frepositorio.udl.edu.pe%2Fbitstream%2FUDL%2F419%2F1%2FTesis%2520Rivas%2520Palacios%2520IA.pdf&cflen=1260624
- Rizo, J. (2015). *Técnicas de Investigación Documental*. Obtenido de <https://repositorio.unan.edu.ni/12168/1/100795.pdf>
- Ronquillo, A. (2021). *Control biológico del picudo de las bananeras Cosmopolites sordidus Germar con el uso de varias cepas Beauveria bassiana en condiciones de laboratorio*. Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fdspace.utb.edu.ec%2Fbitstream%2Fhandle%2F49000%2F10265%2FC-UTB-CEPOS-MPV-000005.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy&cflen=2093820
- Russo, M., Scorsetti, A., Vianna, M., Cabello, M., Ferreri, N., & Pelizza, S. (2019). Endophytic Effects of Beauveria bassiana on Corn (Zea mays) and Its Herbivore, Rachiplusia nu (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 10(110), 1-9. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2075-4450/10/4/110>
- Tipán, D. (2020). *ABUNDANCIA ESTACIONAL DEL CATZO BLANCO (Platycoelia lutescens Blanchard) EN EL ÁREA DE RECREACIÓN LA COCHA, SECTOR TRÉBOLES DEL UR, PARROQUIA QUITUMBE, CANTÓN QUITO*. Tesis de pregrado, UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA, Puyo. Obtenido de <https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/854/1/T.AMB.B.UEA.%20%203293.pdf>

15. ANEXOS

Anexo I. Aval de traducción

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 del proyecto de investigación al idioma Inglés cuyo título versa: **“EVALUACIÓN DE *BEAUVERIA BASSIANA* AISLADO DEL ESTIÉRCOL DE CONEJO PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga spp.*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2021 – 2022”** presentado por **Bermudez Changoluisa Valeria Alejandra**, estudiante de la carrera de **Ingeniería Agronómica**, perteneciente a la **Facultad 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 a la peticionaria hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimare conveniente.

Latacunga, 07 de abril del 2022.

Atentamente,



EDISON MARCELO
PACHECO PRUNA

Lic. Edison Marcelo Pacheco Pruna Mg.
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS
C.C. 050261735-0



CENTRO
DE IDIOMAS

Anexo 2. Informe de anti plagio



Document Information

Analyzed document	VALERIA BERMUDEZ-INV.FINAL.docx (D133488974)
Submitted	2022-04-12T22:52:00.0000000
Submitted by	CHANCUSIG ESPIN EDWIN MARCELO
Submitter email	edwin.chancusig@utc.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	edwin.chancusig.utc@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	PROYECTO CARACTERIZACIÓN DE Metarhizium spp.doc Document PROYECTO CARACTERIZACIÓN DE Metarhizium spp.doc (D35225427)	  2
SA	Ing, Andy Ramon Ronquillo.docx Document Ing, Andy Ramon Ronquillo.docx (D110833607)	  1
SA	Antonio Armando Pozo Álava.docx Document Antonio Armando Pozo Álava.docx (D132874100)	  1
SA	Michelle Rodríguez.docx Document Michelle Rodríguez.docx (D127315095)	  1

Anexo 3. Análisis taxonómico



ANALISIS 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	Bassianólidos	Enniatinas A y B	Beauverolidos	Bassianinas	Tenelinas	osporcinas	Ácidos oxálicos	Oxalatos de calcio
Cepa I	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Metabolitos	Ácido Fusárico	Ácido Deticolínico	Piccolomícina	Efapeptinas	Beauverolidos	Enniatinas	Ciclosporinas	Pyridovericina
Cepa I	+	+	+	+	+	+	+	+

ENZIMAS DETECTADAS

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

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

Anexo 3. Recolección de estiércol de conejo con presencia de micelios.



Anexo 4. Recolección de larvas (Phyllophaga spp.)



Anexo 5. Aislamiento e Identificación de muestras de estiércol de conejo.



Anexo 6. Purificación de muestras de Beauveria bassiana



Anexo 7. Cuantificación de conidios



Anexo 8. Suspensión de B. bassiana



Anexo 9. Inoculación de Beauveria bassiana



Anexo 10. Signo y síntomas que presento (Phyllophaga spp.) durante la investigación.

- Alteración del color en el tegumento



Anexo 11. Esporulación de B bassiana en gallina ciega (Phyllophaga spp.).



Anexo 12. Manual de producción de Beauveria bassiana



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Beauveria bassiana*

AUTORA:

Bermudez Changoluisa Valeria Alejandra

TUTOR:

Chancusig Edwin Marcelo Ing. Ph.D.

LATACUNGA-ECUADOR

ÌNDICE DE CONTENIDOS

1.INTRODUCCIÒN	4
1.1. Características de los principales hongos entomopatógenos	4
1.1.1. Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin.....	4
2. PRODUCCIÒN DE HONGOS ENTÒMOPATOGENOS	6
2.1 CAPTURA.....	6
2.2. ASEPSIA	6
2.3. LAVADO.....	6
2.4. ESTERILIZACIÒN	7
2.5. PREPARACIÒN DE MEDIO DE CULTIVO.....	7
2.5.1. Medio de cultivo.....	7
2.6 AISLAMIENTO.....	8
2.6.1. Aislamiento en estiércol de conejo	8
2.6.2. Aislamiento a partir de insectos.....	8
2.7. IDENTIFICACIÒN	9
2.7.1. Azul de metileno o Lugol.....	9
2.7.2. Cinta adhesiva	9
2.8. CULTIVO MONOSPÒRICO.....	9
2.8.1. Esterilización.....	9
2.8.2. Preparación de medio de cultivo Agar agua (AA)	10
2.8.3. Cosecha de micelios	10
2.8.4. Cámara laminar	11
2.8.5. Solución pura	11
2.9. CONTEO DE COLONIAS	12
2.10. PREPARACIÒN DE DISOLUCIONES SERIADAS	12

2.11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS (CUANTIFICACIÓN EN LA CÁMARA NEUBAUER).....	13
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS	14

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción.....	5
Figura 2: Equipo de esterilización.....	6
Figura 3: Materiales esterilizados	7
Figura 4. Muestras de estiércol de conejo.....	8
Figura 5. Preparación de medio de cultivo.....	10
Figura 6. Insumos para disolución seriada	12
Figura 7. Preparación de solución	11

1.INTRODUCCIÒN

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).

1.1. Características de los principales hongos entomopatógenos

1.1.1. *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

Menciona (Gómez et al., 2014) que este hongo ha sido aislado de más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de cultivos de importancia económica. La fructificación está constituida por células conidiógenas que forman conidios sucesivos en un raquis que se desarrolla en forma de zig zag. Esta fructificación ocurre como sinmema o conjunto de células conidiógenas unidas. En nuestro país esta especie de hongo se utiliza para el control de plagas como (*Hypothenemus hampei*), “gorgojo negro del plátano” (*Cosmopolites sordidus*), “palomillas de la col (*Plutella xylostella*, *Hellula undella*), pulgones, arañas rojas. Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por micelios y esporas del hongo.

Características: Colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálidas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas, en medio (PDA) o Agar Papa Dextrosa Levadura de Cerveza (PDA-LC) presentan aspecto más pulverulento de blanco a crema, abundante esporulación.

1.2. Modo de acción

Describe (Ayala, 2006) que el modelo de acción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se basa de la siguiente manera:

Adhesión. sucede cuando la espora (conidio) es depositada en la superficie del insecto.

Germinación. inicia el desarrollo de su tubo germinativo le permite fijarse a la superficie del insecto.

Penetración. Ingresa por la presión de la superficie y acción de enzimas a través de las partes blandas.

Producción de toxicinas. el hongo ramifica sus estructuras y coloniza las cavidades de hospedante.

Muerte del insecto. marca fin de la fase parasítica e inicia la etapa saprofítica.

Multiplicación y crecimiento. El hongo multiplica sus unidades infectivas (hifas) e invaden los tejidos del insecto.

Figura 1. Modo de acción



Fuente: (Cuervo Mulet & Cali, 2010)

2. PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

2.1 CAPTURA

La utilización de productos a base de hongos entomopatógenos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos biológicos de alta eficiencia en la reducción de las plagas, para las cuales se están utilizando sustratos naturales como arroz, trigo, cebada, maíz y diferentes tipos de estiércol (Cañedo & Ames, 2004)

2.2. ASEPSIA

Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo (Cañedo & Ames, 2004).

Figura 2: Equipo de esterilización



Fuente: Elaboración propia

2.3. LAVADO

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea

enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado (Cañedo & Ames, 2004).

2.4. ESTERILIZACIÓN

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades. La forma más común de esterilización es por calor húmedo o a presión de vapor de agua realizada en el autoclave (Lugo, y otros, 2012).

Figura 3: Materiales esterilizados



Fuente: Elaboración propia

2.5. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

2.5.1. Medio de cultivo

Conjunto de componentes que crea las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Cuervo Mulet & Cali, 2010).

Metodología adaptada de (Mcmillan et al., 2014), para la preparación del medio de cultivo PDA, se realizó el siguiente procedimiento:

Cantidad para el agua destilada: 100 ml a razón de 4 – 5 cajas Petri.

- Pesar 15,6 gr en una balanza analítica, verter este sólido en una botella esterilizadora con 400 ml de agua destilada.
- Agitar la botella de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea, terminado este proceso se llevará a la autoclave para ser esterilizado a 35 °C por 40 min.
- Al terminar el tiempo de esterilización agregar antibiótico, que consiste en la aplicación de una ampolla de Gentamax, para evitar la contaminación de bacterias en el medio de

cultivo proceso realizado en la cámara laminar tras 15 min de enfriamiento de la disolución repartir en placas de Petri estériles y se dejó en reposo para que solidifique.

2.6 AISLAMIENTO

Es la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, la cual puede ser a partir de insectos, plantas, medios artificiales o diferentes tipos de estiércol. A partir del aislamiento del hongo se procede a su inoculación en un medio de cultivo para la obtención de cultivos puros (Gómez, Zapata, Torres, & Tenorio, 2014).

2.6.1. Aislamiento en estiércol de conejo

Colocar las muestras de estiércol de conejo con mayor porcentaje de micelios en cajas Petri con medio de cultivo para la incubación del hongo.

Figura 4. Muestras de estiércol de conejo



Fuente: Elaboración propia

2.6.2. Aislamiento a partir de insectos

Es la obtención del hongo a partir de la cutícula del insecto.

Una vez en el laboratorio, las muestras son procesadas como sigue:

- Remojar el insecto en hipoclorito de sodio (0.5% del producto activo) durante 5 minutos.
- Enjuagar tres a cuatro veces con agua destilada estéril.
- Colocar papel de filtro estéril en una caja Petri esterilizada y agregar agua destilada estéril.
- Colocar el insecto sobre el papel de filtro dentro de la caja.
- Sellar la placa con Parafilm.
- Incubar a 20 °C durante 7 días.

- Con una aguja de siembra, en la cámara de flujo laminar, tocar levemente el cuerpo del insecto donde se vea crecimiento fungoso y transferir su contenido a medio de cultivo.

2.7. IDENTIFICACIÓN

En el proceso de esta fase se realizó siguiendo el protocolo de (CAÑEDO & AMES, 2004) que menciona que para la identificación de hongos se debe realizar un examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas, semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación.

2.7.1. Azul de metileno o Lugol

- Las cepas aisladas deben ser microscópicamente caracterizadas a través de la tinción simple. Para la tinción simple se cubre la extensión debidamente preparada con azul de metileno, al minuto se lava con agua hasta eliminar el exceso de colorante dejando secar al ambiente y finalmente se observa en el microscopio.

2.7.2. Cinta adhesiva

- Se recoge las cajas Petri con el desarrollo de micelio para identificar el tipo de hongo que se desarrolló en el medio de cultivo, se retira el Parafilm para abrir las cajas Petri y se extrae el micelio desarrollado con una aguja de disección se raspa el micelio para colocarlo en un portaobjetos que contenga azul de metileno o Lugol y cubrir con un cubreobjetos.

2.8. CULTIVO MONOSPÓRICO

Se utiliza este método para garantizar la calidad del aislado, y se asegura su potencial como mico insecticida, además se certifica que el aislado está libre de contaminación (excluyendo los micovirus).

Metodología adaptada del protocolo aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos (Mcmillan et al., 2014)

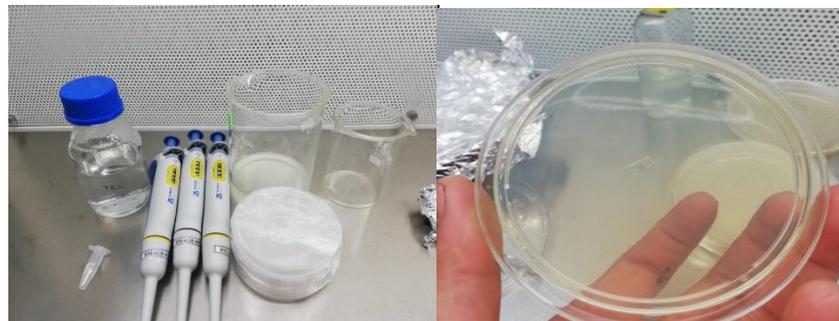
2.8.1. Esterilización

- Colocar en el autoclave las pinzas, tijeras, punta de pipetas amarillas envolver en papel aluminio para su desinfección.

2.8.2. Preparación de medio de cultivo Agar agua (AA)

- Pesar 0,5 gr de agar en una balanza analítica.
- En una botella esterilizadora colocar 50 ml de agua destilada previamente desinfectada y vertir el sólido.
- Agitar la botella de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea, terminado este proceso llevar al autoclave para ser esterilizado a 35 °C por 40 min.
- Una vez enfriado la solución en la cámara de flujo laminar colocar una capa fina del medio de cultivo (AA) sobre 3 caja Petri se esperó hasta que se solidifiquen.

Figura 5. Preparación de medio de cultivo

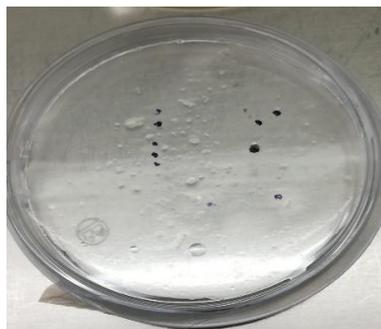


Fuente: Elaboración propia

2.8.3. Cosecha de micelios

- Extraer dos cajas Petri de la incubadora con presencia de micelios, en la cámara de flujo laminar con ayuda de una asa bacteriológica y agua destilada raspar los micelios presentes en las cajas.
- Agitar la solución durante 10 segundos para que se desprendan las partículas.

Figura 6. Cosecha de micelios

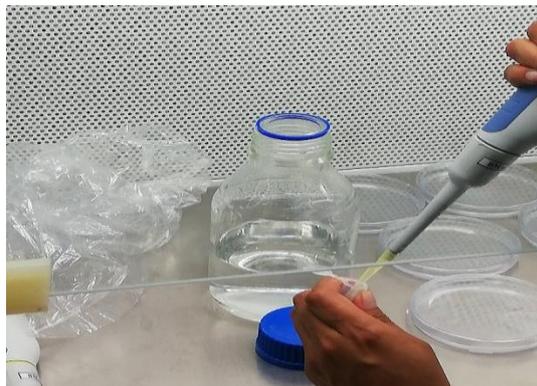


Fuente: Elaboración de propia

2.8.4. Procedimiento en la cámara laminar

- Encender el mechero en la cámara laminar para evitar contaminación durante las actividades a realizar.
- Colocar todos los insumos de trabajo (2 micropipetas de 100 μL 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 μL colocar el agua destilada en un tubo eppendorf repetir este proceso 4 veces hasta obtener 800 μL en los 2 tubos eppendorf.
- Realizar la segunda disolución, con 100 μL de la solución madre y agregar 90 μL de agua destilada, cambiar la pipeta de punta amarilla y con la misma micropipeta 100 μL colocar la solución que contiene el hongo, contenido de 1 ml en cada eppendorf.
- Agitar en un vòrtex por un espacio de 10 segundos.

Figura 7. Preparación de solución



Fuente: Elaboración propia

2.8.5. Solución pura

- Con una micropipeta de 200 μL colocar en un tubo eppendorf la solución que contine el hongo y agitar en un vòrtex por 10 segundos.
- Sembrar los 10 μL o 1 ml contenidas de los tubos eppendorf en las cajas Petri y se distribuyó hasta cumplir toda la caja.
- Colocar en la incubadora durante 24 horas a 26 $^{\circ}\text{C}$.
- En un microscopio ubicar una espora germinada.
- Señalar con una asa microbiológica y marcador en el reverso de la placa.

- Cortar con una hoja de bisturí estéril el bloque de agar que contiene la espora y se trasfirió a un medio de cultivo PDA con antibiótico.
- Llevar a incubar a 26 °C por 8 a 10 días, al cabo de este tiempo seleccionar las colonias monospóricas sin contaminantes y que presenten las características típicas del hongo sembrado.

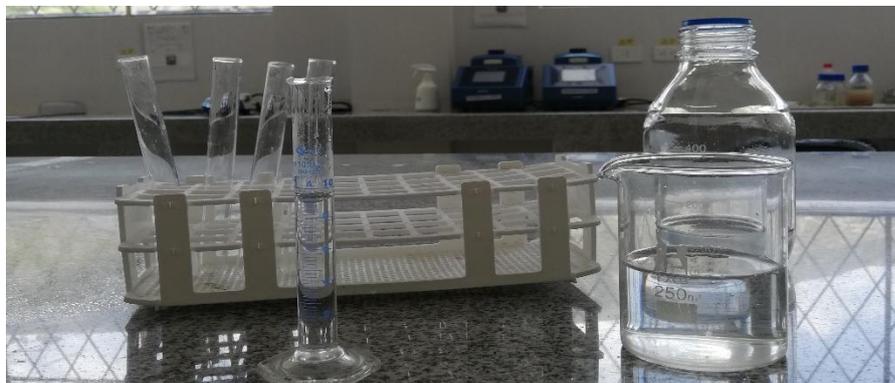
2.9. CONTEO DE COLONIAS

- Adaptado de (Baez et al., 2019) para el conteo de colonias, el cual se detalla a continuación:
- Retirar de la incubadora las cajas Petri con medio de cultivo PDA que es donde se desarrolla *Beauveria bassiana*.
- Con un asa microbiológica raspar la parte de micelios que contiene las cajas Petri (2 cajas) esta suspensión se llenó 100 ml de agua destilada en una probeta.
- Agitar en un vórtex hasta que la muestra se disperse completamente. La suspensión obtenida corresponde a la solución madre.

2.10. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES SERIADAS

- Se tomó 1ml con una micropipeta de la solución madre.
- Colocar en cuatro tubos de ensayo 9 ml de agua destilada.
- Agitar en un vórtex hasta que la muestra se disperse totalmente.
- Replicar 4 veces el proceso anteriormente mencionado hasta llegar a la concentración 10^8 .

Figura 6. Insumos para disolución seriada

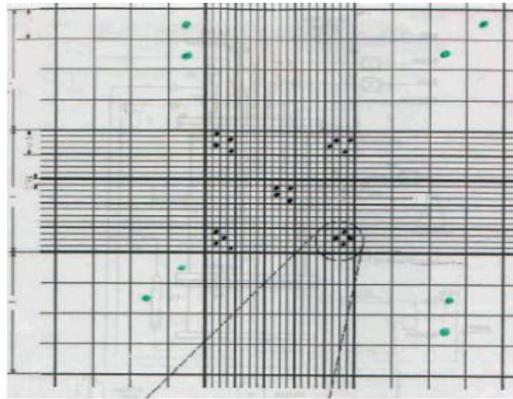


Fuente: Elaboración propia

2.11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS (CUANTIFICACIÓN EN LA CÁMARA NEUBAUER).

- Procedimiento adaptado de (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007)
- Con una micropipeta de 100 μ L extraer la solución de la muestra 104.
- Transferir la muestra a la cámara Neubauer, hasta que por caparidad se llene un lado de la cámara.
- Llevar la cámara al microscopio y observar con el mejor lente para esta actividad ubicaren el primer cuadrante (superior derecho).

Cuantificar los conidios presentes en el cuadrante central, como se indica en la figura.



Fuente: (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007)

Para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) se utiliza la fórmula ajustada de Gómez, et al, (2014):

$$\text{UFC} = \bar{x} * 10000 * \text{FD}$$

Donde:

\bar{x} : Promedio de las lecturas por área de conteo.

FD: Factor de disolución.

10 000: constante del cuadrante central

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, January, 10. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Baez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., Jaronski, S., & Viera, W. (2019). *Manual de analisis de calidad para formulaciones con base en hongos biocontroladores* (p. 45). <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5553>
- CAÑEDO, V., & AMES, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Corallo, B. (2016). *seleccion y caracterizacion de hongos entomopatogenos para controlar thaumastocoris en Eucalyptus spp.* 2–86. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10171/1/uy24-18331.pdf>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147–156. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37416/40417>
- Cuervo Mulet, R. A., & Cali. (2010). Manual de protocolos de microbiología general. In *Biblioteca Digital Universidad de San Buenaventura*. <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsbas&AN=edsbas.3F7FF71A&lang=es&site=eds-live>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Servicio Nacional de Sanidad Agrícola (SENASA)*, 37. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
- Mcmillan, R. T., Jr, R. T., Avila, G. D. Q., Tijerina, L. C., Thysanoptera, P., On, C., Of, A., Gaskin, R. E., Pak, H. A., Wu, Y., Liu, K., Qiu, H., Li, F., Cao, Y., Restrepo, T., Tolima,

N., Rodríguez-valenzuela, J., & Varón-devia, E. H. (2014). Aislamiento , identificación y evaluación de hongos entomopatógenos como posibles agentes de control de trips (Thysanoptera : Thripidae) asociados a cultivos de aguacate (Persea americana Miller) Aislamiento , identificación y evaluación de hongos ent. *Film*, 67(2), 292–297. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61221209.pdf>