



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

Título:

“EVALUACIÓN DE *Beauveria Bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOESPÓRICO PARA EL CONTROL DE GUSANO BLANCO DE LA PAPA (*Pemnotrypes vorax*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2022”

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

Autora:
Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth

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

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2022

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Kateryn Lisbeth Caillagua Tayo, con cédula de ciudadanía No. 1753586682, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: “Evaluación de *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monoespórico para el control de gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*)”, siendo el Ingeniero Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 22 de agosto del 2022

Kateryn Lisbeth Caillagua Tayo
Estudiante
CC: 1753586682

Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.
Docente Tutor
CC: 0501148837

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **CAILLAGUA TAYO KATERYN LISBETH**, identificada con cédula de ciudadanía **1753586682** 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 Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Evaluación de *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monoespórico para el control de gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) en condiciones de laboratorio campus Salache 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: octubre 2018 - marzo 2019

Finalización de la carrera: octubre 2021 – marzo 2022

Aprobación en Consejo Directivo: 3 de junio del 2022

Tutor: Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, PhD.

Tema: “Evaluación de *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monoespórico para el control de gusano blanco de papa (*Premnotrypes vorax*) en condiciones de laboratorio campus Salache 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:

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

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

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **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 solicite.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 22 días del mes de agosto del 2022.

Kateryn Lisbeth Caillagua
LA CEDENTE

Ing. Cristian Tinajero Jiménez, Ph.D.
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOESPÓRICO PARA EL CONTROL DE GUSANO BLANCO (*Premnotrypes vorax*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2022”, de Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 22 de agosto del 2022

Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Ph.D.

DOCENTE TUTOR

CC: 0501148837

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth, con el título del Proyecto de Investigación: “EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOESPÓRICO PARA CONTROL DE GUSANO BLANCO (*Premnotrypes vorax*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2022”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

Latacunga, 22 de agosto del 2022

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

Lector 2
Ing. Giovana Parra Gallardo, Mg.
CC: 1802267037

Lector 3
Ing. Jorge Troya Sarzosa, Ph.D.
CC: 0501645568

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios por mantenerme viva y con salud. Gracias a mi querida Universidad Técnica de Cotopaxi por haberme permitido formar parte de ella, gracias a todas las personas que fueron participes en este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, también a mi tutor Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, que me guio para poder realizar de mejor manera el proyecto de investigación, gracias a la Ing. Tania Llanos que nos apoyó en la instancia que estuvimos en laboratorio que ahora se ve reflejado en la culminación de mi paso por la universidad. Gracias a mis padres que fueron mis mayores promotores durante este proceso, también a mi pareja que fue una clave muy importante en este proceso, a mis abuelitos que con su amor siempre estaban para mí, gracias a mis tíos que siempre me daban ánimos, a mis hermanos que siempre me motivaron para seguir adelante.

Este momento es muy especial que espero, que perdure en el tiempo, no solo en la mente de las personas que agradezco, también a mis amigos quienes invirtieron su tiempo para echarle una mirada a mi proyecto, les agradezco con todo mi ser

Kateryn Lisbeth Caillagua Tayo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres Anita y Raul por ser un pilar súper importante durante este proceso, por su apoyo incondicional a pesar de tener nuestras diferencias. A mis hermanos Andrea, Dillan y Arlette que son lo mejor que tengo en este mundo. A mi pareja Luis que siempre me apoyó con todo lo que me proponía también a mis abuelitos, Tíos/as que siempre me daban ánimos para salir adelante, a mis amigos David, Mauro, Fer y Karlita quienes sin esperar algo a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías, tristezas y a todas esas personas que durante este proceso estuvieron a mi lado apoyándome y logrando que mis sueños se hagan realidad.

Katy C.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOESPÓRICO PARA EL CONTROL DE GUSANO BLANCO DE LA PAPA (*Premnotrypes vorax*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2022”.

AUTOR: Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth

RESUMEN

El gusano blanco afecta al cultivo de papa en estadio de larva al tubérculo, provocando pérdidas de producción entre el cincuenta y sesenta por ciento, por tal motivo el propósito de esta investigación fue determinar la mejor concentración para el control de *Premnotrypes vorax* e identificar el mejor sustrato durante el proceso de investigación. El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi. El proceso de la investigación constó de algunas fases: la multiplicación, elaboración, el conteo de conidios para determinar las concentraciones y la última fase constó de la aplicación de la concentración de *Beauveria bassiana* en las unidades experimentales. El diseño experimental fue un arreglo factorial $A \times B + 1$ adicional con cuatro repeticiones, donde el Factor A corresponde a las concentración de conidios ($10^8, 10^9, 10^{10}$ conidios /ml), el Factor B corresponde a los sustratos (esterilizado - no esterilizado), obteniendo un total de 28 unidades experimentales con 15 larvas por cada unidad experimental. La variable en estudio fue el porcentaje de mortalidad para realizar los resultados se utilizó un programa llamado Infostat y al obtener el ADEVA con los resultados estadísticamente significativos, se aplicó la prueba Tukey al 5% para obtener los diferentes rangos de significancia. El resultado para el porcentaje de mortalidad se determinó que el tratamiento T6 (concentración 10^{10} conidios /ml con sustrato sin esterilizar) con mayor porcentaje de un 100%, siendo el mejor en comparación con el adicional que no presentó larvas muertas, seguido del Tratamiento T5 (esterilizado con concentración 10^{10} conidios /ml con un porcentaje de 91,5%. Por lo tanto, se concluye que la mejor concentración fue 10^{10} conidios /ml para controlar la larva de *Premnotrypes vorax*, además que en el sustrato no existió diferencia significativa entre los sustratos (estéril y no estéril) para el control del gusano blanco de la papa, así se demostró que *Beauveria bassiana* no dependió del sustrato.

Palabras clave: *Premnotrypes vorax*, *Beauveria bassiana*, concentración, sustrato, mortalidad.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TITLE: "EVALUATION OF *Beauveria bassiana* FROM A MONOSPORIC CULTURE FOR THE CONTROL OF WHITE POTATO WORM (*Premnotrypes vorax*) UNDER LABORATORY CONDITIONS CAMPUS SALACHE 2022".

AUTHOR: Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth

ABSTRACT

The white worm affects the potato crop in the larval stage to the tuber, causing production losses between fifty and sixty percent, for this reason the purpose of this research was to determine the best concentration for the control of *Premnotrypes vorax* and identify the best substrate during the research process. The study was conducted in the microbiology laboratory of the Technical University of Cotopaxi. The research process consisted of some phases: multiplication, elaboration, counting of conidia to determine concentrations and the last phase consisted of the application of the concentration of *Beauveria bassiana* in the experimental units. The experimental design was an additional AxB+1 factorial arrangement with four repetitions, where Factor A corresponds to the concentrations of conidia (10^8 , 10^9 , 10^{10} conidia /ml), Factor B corresponds to the substrates (sterilized - not sterilized), obtaining a total of 28 experimental units with 15 larvae for each experimental unit. The variable in the study was the percentage of mortality to perform the results, a program called Infostat was used and when obtaining the ADEVA with the statistically significant results, the Tukey test was applied to 5% to obtain the different ranges of significance. The result for the percentage of mortality was determined that the T6 treatment (concentration 10^{10} conidia /ml with unsterilized substrate) with a higher percentage of 100%, being the best compared to the additional one that did not present dead larvae, followed by the T5 Treatment (sterilized with concentration 10^{10} conidia /ml with a percentage of 91.5%. Therefore, it is concluded that the best concentration was 10^{10} conidia /ml to control the larva of *Premnotrypes vorax*, in addition to the fact that in the substrate there was no significant difference between the substrates (sterile and non-sterile) for the control of the white potato worm, thus it was shown that *Beauveria bassiana* does not depend on the substrate.

Key words: *Premnotrypes vorax*, *Beauveria bassiana*, concentration, substrate, mortality

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xvi
CAPÍTULO I	1
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	3
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	3
4.1 Beneficiarios Directos	3
4.2 Beneficiarios Indirectos	4
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
5.1 Formulación del problema	5
6. Objetivos	5
6.1 Objetivo General	5
6.2 Objetivos Específicos	5
7. ACTIVIDADES Y SISTEMAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS	6
CAPÍTULO II	8
8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	8

8.1 Eficacia	8
8.2 Gusano blanco (<i>Premnotrypes vorax.</i>)	8
8.3 Importancia Económica	8
8.4 Taxonomía de la plaga	8
8.5 Ciclo de la vida del gusano	9
8.5.1 Huevos	10
8.5.2 Larvas	10
8.5.3 Prepupa	10
8.5.4 Pupa	10
8.5.5 Adulto	10
8.6 Hábitos y daños	11
8.7 Manejo integrado de <i>Premnotrypes vorax</i>	11
8.8 Métodos culturales	11
8.8.1 Preparación del suelo	11
8.8.2 Fechas de siembra	11
8.8.3 Periodo de campo limpio	11
8.8.4 Cosecha completa	12
8.8.5 Rotación de cultivos	12
8.8.6 Métodos mecánicos	12
8.8.7 Trampas	12
8.8.9 Plantas cebo	12
8.9 Control Químico	12
8.10 Control biológico	13
8.11 Hongos entomopatógenos	13
8.12 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	13
8.13 Factores que influyen en el desarrollo del hongo	13
8.14 <i>Beauveria bassiana</i>	14

8.15 Clasificación taxonómica	14
8.16 Morfología	15
8.16.1 Características macroscópicas	15
8.16.2 Características microscópicas	15
8.17 Desarrollo del hongo	15
8.18 PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>)	16
8.18.1 Taxonomía y Morfología de la papa	17
Capítulo III	18
9. HIPÓTESIS	18
9.1 Hipótesis Nula= H0	18
Con la aplicación de al menos una de las concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> se logrará la mortalidad del gusano blanco de la papa (<i>Premnotrypes vorax</i>)	18
9.2 Hipótesis Alternativa =H1	18
10. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	18
10.1 Localización del ensayo	18
10.2 Tipo de Investigación	19
10.2.1 Experimental	19
10.2.2 Cualitativa- Cuantitativa	19
10.3 Modalidad básica de investigación	19
10.3.1 Campo	19
10.3.2 Laboratorio	19
10.3.3 Bibliográfica	19
10.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	20
10.4.2 Observación de campo	20
10.4.3 Registro de datos	20
10.4.4 Análisis estadístico	20
10.5 MATERIALES Y EQUIPOS	20

10.5.1	Material biológico	20
10.5.2	Materiales de campo	20
10.5.3	Materiales de oficina	20
10.5.4	Materiales de laboratorio	21
10.5.5	Insumos y reactivos	21
10.5.6	Equipos	21
10.6	Diseño experimental	22
10.6.1	Unidad Experimental	22
10.7	Factores de estudio	22
10.8	Tratamiento en estudio	22
10.8.1	Distribución del ensayo	23
10.9	ADEVA	23
10.10	Operación de variables	23
10.11	Manejo específico del experimento	23
10.11.1	Fase de recolección de larvas de gusano blanco de la papa.	24
10.11.2	Fase de laboratorio	24
10.11.2.1	Medio de cultivo	24
10.11.2.2	Método de multiplicación	25
10.11.2.3	Método para el conteo de UFC (Unidad formadora de colonias)	26
10.11.2.4	Concentración de conidios (Cuantificación en la cámara de Neubauer)	26
10.11.2.5	Elaboración de la solución madre	27
10.12	Implementación del diseño experimental	28
10.12.1	Esterilización de sustratos	28
10.12.2	Desinfección de larvas	28
10.12.3	Rotulado de las bandejas	29
10.12.4	Acondicionamiento de gusano blanco de la papa (<i>Premnotrypes vorax</i>)	29
10.13	Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i>	29

10.14	Datos a evaluar	30
10.14.1	Mortalidad de larvas	30
10.5	Análisis estadístico	30
CAPÍTULO IV		31
11.	ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	31
11.1	ANÁLISIS DE MORTALIDAD	31
CAPÍTULO V		35
12.	CONCLUSIONES	35
13.	RECOMENDACIONES	35
14.	PRESUPUESTO	36
15.	BIBLIOGRAFIA	38
16.	ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos.....	6
Tabla 2: Taxonomía del gusano blanco de la papa.....	9
Tabla 3: Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	14
Tabla 4: Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	14
Tabla 5: Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	17
Tabla 6: Tratamientos, códigos, descripción	22
Tabla 7: Diseño de Bloques Completamente al Azar.....	23
Tabla 8: Cuadro adeva.....	23
Tabla 9: Definición de variables e indicadores	23
Tabla 10: Datos geográficos de la recolección.....	24

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análisis de la Varianza para la variable mortalidad.....	9
Gráfico 2: Estructura de <i>Beauveria bassiana</i> ; a) aparato conidial, b) células conidiógenas, c) conidias.....	15
Gráfico 3: Ubicación del proyecto.....	18
Gráfico 4: Ubicación geográfica del lugar donde se recolectaron las larvas.....	24
Gráfico 5: Porcentaje de mortalidad total de los tratamientos.....	31
Gráfico 6: Prueba de Tukey para el Facto A	33
Gráfico 7: Prueba de Tukey Factor B.....	34
Gráfico 8: Prueba de Tukey para Factor A*B	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Adquisición de cepa madre de <i>Beauveria bassiana</i>	41
Anexo 2: Multiplicación de <i>Beauveria bassiana</i>	41
Anexo 3: Esterilización del sustrato	42
Anexo 4: Implementación del ensayo	42
Anexo 5: Colocación de larvas de <i>Premnotrypes vorax</i>	42
Anexo 6: Implementación de tubérculos en las unidades experimentales	43
Anexo 7: Elaboración de solución madre	43
Anexo 8: Conteo de conidios para la elaboración de las concentraciones	43
Anexo 9: Aplicación de las concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i>	44
Anexo 10: Registro de mortalidad del gusano blanco de la papa	44
Anexo 11: Identificación de <i>Beauveria bassiana</i> en las larvas muertas.	44
Anexo 12: Insectos infestados de <i>Beauveria bassiana</i> en PDA	45
Anexo 13: Hoja de vida	46
Anexo 14: Protocolo	47
Anexo 15: Abstract	54

CAPÍTULO I

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título:

“EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana*, A PARTIR DE UN CULTIVO MONOESPÓRICO PARA CONTROL DE GUSANO BLANCO DE LA PAPA (*Premnotrypes vorax*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO CAMPUS SALACHE 2022”

Fecha de inicio:

Mayo del 2022.

Fecha de finalización:

Agosto del 2022.

Lugar de ejecución:

Campus Salache, Barrio Eloy Alfaro, cantón Latacunga, provincia 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:**

Tutor: Ing. Ph.D. Edwin Chancusig

Autora: Kateryn Lisbeth Caillagua Tayo

Coordinador del Proyecto

Nombre: Kateryn Lisbeth Caillagua Tayo

Teléfonos: 0988165839

Correo electrónico: kateryn.caillagua6682@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura - Agricultura, silvicultura y pesca - producción agropecuaria

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local

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

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Caracterización de la biodiversidad

Línea de vinculación

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

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto se llevó a cabo en la facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi en donde se realizó la investigación de Evaluación de *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monoespórico para el control de gusano blanco de papa (*Pemnomotrypes vorax*), en condiciones de laboratorio Campus Salache 2022, para entender los beneficios de este hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de estas plagas ya que afectan al sector económico de los diferentes agricultores productores del cultivo papa.

3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El cultivo de papa tiene altos niveles de consumo así como de mayor producción en Ecuador y a nivel mundial con 341 millones de toneladas en una superficie de 20 millones de hectáreas. China es el productor más grande y produce entre 66 y 71 millones de toneladas. Otros productores grandes son Rusia, La India, Polonia, EEUU, Ucrania, Alemania, Países Bajos y Belarús. (Yara, 2022)

En Ecuador, el cultivo de la papa es uno de los principales cultivos con la participación de más de 82.000 agricultores. La producción es principalmente para consumo interno, alrededor del 81% se comercializa para consumo en fresco y el resto es utilizado por industrias para procesamiento. (Iniap, 2014)

En los últimos años, alrededor de 45.000 unidades agrícolas producen un promedio anual de 520.000 toneladas por año, en una superficie de alrededor de 60.000 ha. Producción que se localiza principalmente en las provincias de Carchi, Chimborazo, Tungurahua, Pichincha, Cotopaxi y Cañar. (Iniap, 1999)

En Cotopaxi cuenta con cerca de 5 mil hectáreas dedicadas a los cultivos de papas, las plagas y enfermedades de la papa reducen el rendimiento y afectan la calidad del producto. (Lopez, 2019)

Gusano blanco de la papa o Gorgojo de los Andes, alcanzan pérdidas hasta el 50% en los cultivos de papa. Sus larvas perforan el tubérculo, formando túneles en los que depositan sus excrementos dañando el cultivo. En Ecuador en Cañar, Carchi, Chimborazo y Cotopaxi, las pérdidas comerciales de tubérculos oscilan entre el 20 y 50%. (Salamanca y Vélez, 2013)

Teniendo en cuenta los daños que provoca esta plaga varios centros de investigación han mostrado la necesidad de optar por nuevas estrategias para manejar las plagas como el control biológico del insecto mediante el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* el cual representa una alternativa ecológica sostenible para el control de gusano blanco.

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El beneficiario de este proyecto de investigación será cualquier persona interesada en el tema de investigación.

4.1 Beneficiarios Directos

Para material bibliográfico, académico de la Universidad Técnica de Cotopaxi, a los

estudiantes de la carrera de Agronomía quienes realizan sus proyectos institucionales, a los diferentes investigadores para que se basen en la información obtenida mediante el proyecto de investigación y a los diferentes agricultores dándoles una alternativa para controlar el gusano blanco de la papa con hongos entomopatógenos con es *Beauveria bassiana*.

4.2 Beneficiarios Indirectos

A las diferentes instituciones públicas y privadas como material con fines educativos en el ámbito de biocontroladores puesto que la investigación es de interés para productores agrícolas y agricultores.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta un 40% de la producción agrícola mundial se pierde por causa de las plagas que llegan a afectar a los diferentes cultivos, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Las plagas no sólo reducen la producción agrícola, sino que también desmejoran la calidad de los cultivos, lo cual supone grandes repercusiones sobre el sector rural. (Agroasemex, 2019)

Los daños provocados en el tubérculo se hacen evidentes en el momento de la cosecha. En las provincias de Cañar, Carchi, Chimborazo y Cotopaxi, los niveles de pérdida del valor comercial de los tubérculos afectados oscilan entre 20 y 50%. (Salamanca y Vélez, 2013)

Las pérdidas en valor de venta causado por el daño del gusano blanco en los tubérculos son: en la provincia de Cotopaxi un promedio de 50%, en Chimborazo es del 44%, en el Carchi el 37 % y en Cañar es del 22 %, en comparación con los tubérculos sanos. Cuando el ataque de esta plaga es severo se puede ocasionar la pérdida total del cultivo. (Gallegos *et al.*, 1997)

Actualmente, la papa es el cultivo en el que se aplica la mayor cantidad de pesticidas en el mundo. El CIP estima que anualmente los agricultores gastan más de 300 millones de dólares en pesticidas para proteger este cultivo. (Peña y Bolaños, 1997)

La mayoría de los agricultores han utilizado productos químicos como único medio de control, evitando el uso de otras prácticas disponibles que, cuando se aplican de manera integrada, reducen los costos de producción, reducen los problemas ambientales y también ayudan a que el cultivo sea más competitivo y sostenible como también creando resistencias de las diferentes plagas con el uso de los diferentes insecticidas.

En el presente trabajo expuesto se evaluó el control de gusano blanco de la papa mediante el uso de *Beauveria bassiana* como una alternativa eficiente, económica para el sector productivo y diferentes agricultores.

5.1 Formulación del problema

¿Podrá controlar la *Beauveria bassiana* al gusano blanco de la papa (*Premnotrypes Vorax*) en diferentes concentraciones bajo condiciones controladas?

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar *Beauveria bassiana* a partir de un cultivo monoespórico para el control del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes Vorax*), en el Laboratorio Campus Salache 2022.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar la mejor concentración para el control de *Premnotrypes vorax*.
- Identificar el mejor sustrato (esterilizado – no esterilizado), en el comportamiento de *Beauveria bassiana*.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

Tabla 1: Actividades y sistema de tareas en relación a los objetivos.

OBJETIVO	ACTIVIDAD	RESULTADOS	MEDIO DE VERIFICACIÓN
Determinar la mejor concentración para el control de <i>Premnotrypes vorax</i> .	Elaboración del medio de cultivo (PDA) que se utilizará y se verterá en las diferentes cajas Petri.	Medio de cultivo para el desarrollo del hongo.	Fotografías Cajas Petri
	Esterilización de los diferentes materiales que se utilizara para multiplicar <i>Beauveria bassiana</i>	Materiales Esterilizados sin contaminación.	Fotografías
	Multiplicar <i>Beauveria bassiana</i> de una cepa madre aislada a partir de estiércol de conejo bajo condiciones de laboratorio	Multiplicar en más cajas Petri	Fotografías
	Colocar en la incubadora a 28 ° para la reproducción del hongo.	Esperar de 6 a 7 días para que la <i>Beauveria bassiana</i> se desarrolle	Fotografías
	Realizar la solución madre de <i>Beauveria bassiana</i> .	Solución de concentraciones de conidios 10 ⁸ , 10 ⁹ , 10 ¹⁰ .	Fotografías Libro de Campo
	Conteo de UFC (Unidades formadoras de colonias) de <i>Beauveria bassiana</i> .	Cajas Petri de <i>Beauveria bassiana</i> para la concentración de los conidios requeridos para la solución madre.	Fotografías
	Aplicación de las diferentes concentraciones sobre los ensayos implementados	Control de la <i>Beauveria bassiana</i> sobre la plaga.	Fotografías Libro de campo
	Registro de datos cada 3 días después de la aplicación de	Datos registrados los análisis respectivos.	Libro de campo Libro excel

	<i>Beauveria bassiana.</i>		
Identificar el mejor sustrato (esterilizado – no esterilizado), en el comportamiento de <i>Beauveria bassiana.</i>	Se mezcló la tierra negra con la turba creando una mezcla homogénea.	Sustrato	Fotografías
	Se colocó el sustrato en bandejas de aluminio	Esterilización del sustrato	Fotografías
	Para el sustrato sin esterilizar se procedió a mezclar tierra + turba y se colocó en las bandejas de la diferentes unidades experimentales	Sustrato sin Esterilizar	Fotografías
	Recolección de larvas muertas infectadas de <i>Beauveria bassiana.</i>	En cajas Petri con algodón creando un ambiente húmedo.	Fotografías Cajas Petri
	Identificación de <i>Beauveria bassiana</i> en larvas muertas colocando en un medio de cultivo (PDA)	Observación mediante el estereoscopio y microscopio.	Fotografías Cajas Petri PDA
	Aplicación la fórmula para sacar la mortalidad Tabulación de datos	Programa Excel Datos recolectados durante la investigación.	Libro de campo Libro de Excel

CAPÍTULO II

8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

8.1 Eficacia

La eficiencia es la capacidad de lograr un efecto esperado o deseado después de realizar una acción. (Perez y Merino, 2021)

8.2 Gusano blanco (*Premnotrypes vorax*.)

El gusano blanco *Premnotrypes vorax* es considerado como una de las plagas más importantes del cultivo de papa en la parte alta de la sierra ecuatoriana. Se le conoce con algunos nombres como “el gorgojo de los andes” “cusca” o “cucarrón de la papa”. (Torres *et al.*, 2011)

8.3 Importancia Económica

Como señala (Huraca y Gallegos, 2012) el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) es una plaga importante del cultivo de papa en las zonas altas del Ecuador. En las provincias de Carchi, Chimborazo, Cotopaxi y Cañar, los niveles de pérdidas del valor comercial de los tubérculos afectados oscilan entre el 20% y 50 %, la misma que puede ocasionar pérdidas totales principalmente debido a la falta de conocimientos ya sea de los pequeños y grandes productores para el manejo de esta plaga.

Para reducir la magnitud de los daños, los productores utilizan altas dosis de pesticidas que contaminan el medio ambiente, el suelo, el agua y el ecosistema en general.

8.4 Taxonomía de la plaga

Se da a conocer la taxonomía del insecto:

Tabla 2: Taxonomía del gusano blanco de la papa

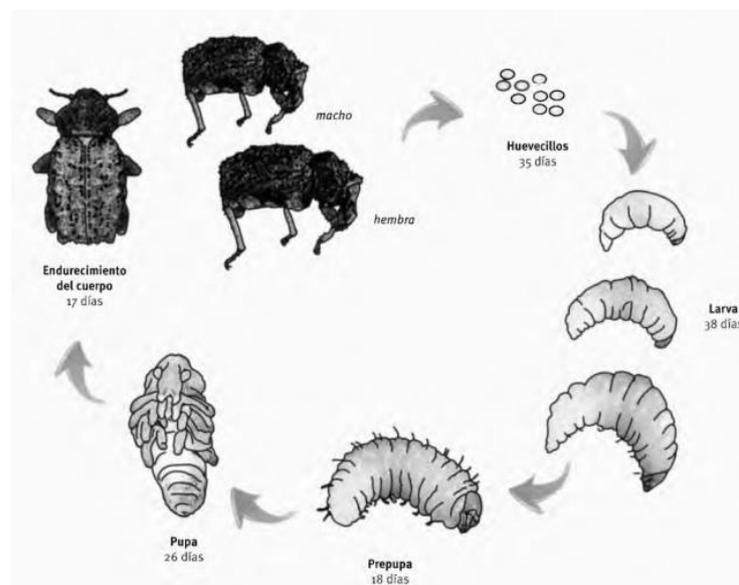
Taxonomía del Gusano blanco (<i>Premnotrypes vorax</i>)	
Orden	Coleoptera
Suborden	Polyphaga
Superfamilia	Curculionoidea
Familia	Curculionidae
Género	Premnotrypes
Especie	Vorax

Fuente: (Maldonado, 1993)

8.5 Ciclo de la vida del gusano

Según (Peña y Bolaños, 1997) la duración del ciclo de vida del gusano blanco (*Premnotrypes Vorax*), oscila entre 95 a 283 días, dependiendo del lugar donde se reproducen y la altura sobre el nivel del mar.

Gráfico 1: Análisis de la Varianza para la variable mortalidad.



Fuente: (Huraca y Gallegos, 2012)

8.5.1 Huevos

Los huevos tienen forma alargada y son muy pequeños miden entre 1,7 de largo y 0,5 mm de diámetro, están recubiertos de una sustancia pegajosa al inicio son de color blanco brillante a medida que va madurando tienen un color amarillo manteca, eclosionan entre 20 a 30 días. (Huraca y Gallegos, 2012)

8.5.2 Larvas

El gusano o larva es de color blanco cremoso, con la cabeza de color café, el cuerpo tiene forma de "C" pasan por 5 a 6 instares larvales, midiendo 1,12 mm de longitud y al final llegan a medir entre 11 a 14 mm, el daño se hace visible cuando el gusano crece, se alimenta del tubérculo formando túneles, esto llega a ser desagradable por la presencia de excremento y pudriciones. (Huraca y Gallegos, 2012)

8.5.3 Pre pupa

Las larvas entran a un estado de pre pupa cuando no llega hacer algún daño al tubérculo, preparan una celda de tierra para pasar el estado de pupa, permaneciendo en este estado durante 20 días. (Huraca y Gallegos, 2012)

8.5.4 Pupa

Cuando el gusano ha madurado, sale del tubérculo y se dirige al suelo para convertirse en pupa esta cambia de forma, lo cual ocurre dentro de una celda formada con tierra, al principio toma un color blanco cuando esté madura toma un color amarillento, en la transformación comienza aparecer las patas, pico y alas, la duración de este estado es de 20 a 32 días. (Huraca y Gallegos, 2012)

8.5.5 Adulto

Este es un insecto de aproximadamente 7 mm de largo y 4 mm de ancho. El cuerpo es de color gris, aunque puede tomar el color del suelo dependiendo del lugar donde se encuentre haciendo así difícil su reconocimiento, la hembra es más grande que el macho de aspecto redondeado, el macho es más pequeño y alargado. (Huraca y Gallegos, 2012)

8.6 Hábitos y daños

Menciona (Gallegos *et al.*, 2017) que durante el día, los adultos prefieren esconderse en lugares frescos, oscuros y húmedos, como en terrones o debajo de los arbustos. Durante la noche, los adultos recorren los campos en busca de alimento pueden recorrer hasta 12m en una noche y se dice que 1 km en 6 meses.

La hembra deposita los huevecillos desde la primera semana dentro de 3 a 5 días entre 13 a 21 huevos estos ponen un total de 260 huevecillos, estos buscan de alimento las hojas de la papa se comen los bordes realizando una media luna causando daños, también afectan a la base del tallo en caso de no obtener alimento consumen parte del tubérculo cuando estos se encuentran expuestos a la superficie del suelo. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.7 Manejo integrado de *Premnotrypes vorax*

Señala (Barrera y Crisman, 1999) que este tiene objetivo reducir los daños, reducir los costos de protección de cultivos y reducir o evitar los efectos secundarios indeseables causados por los pesticidas. El mejor control del gusano blanco de la papa se basa en la aplicación secuencial de una serie de medidas para que cada una contribuya a una mejor sanidad del tubérculo.

8.8 Métodos culturales

Estos son métodos que involucran la manipulación de factores ambientales. Se basan en el conocimiento de la plaga y su relación con el cultivo. (Bastidas *et al.*, 2005)

8.8.1 Preparación del suelo

Con una adecuada preparación del suelo, las larvas y pupas pueden quedar expuestas a los efectos de la luz solar y al ataque de pájaros u otros animales. También favorece que los adultos se liberen de su celda pupal. (Bastidas, y otros, 2005)

8.8.2 Fechas de siembra

Al retrasar la siembra después de la labranza, se rompe el ciclo del insecto que se ha adaptado a las diferentes etapas del cultivo. (Bastidas *et al.*, 2005)

8.8.3 Periodo de campo limpio

La ausencia de diferentes plantas en el campo al menos 30 días antes de la siembra afectará la supervivencia de las larvas. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.8.4 Cosecha completa

En el terreno no debe quedar ninguna planta sin cosechar, ni dejar tubérculos en la superficie del terreno. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.8.5 Rotación de cultivos

La aplicación de este método puede interrumpir el ciclo de vida de los insectos y así reducir su población. Lo mejor es rotar cultivos con cultivos que necesitan deshierbe. Rotar tres cultivos consecutivos reducirá el daño en un 30%. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.8.6 Métodos mecánicos

Se pueden usar varias formas que permitan matar directamente a la plaga o impedir su ingreso al campo del cultivo (Bastidas *et al.*, 2005)

8.8.7 Trampas

Está cumple la función de atraer y dar refugio a los adultos del gusano blanco durante el día ya que de esta manera se puede concentrar la población para eliminarla con insecticidas químicos o biológicos. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.8.9 Plantas cebo

Su función es atraer a los adultos nocturnos para alimentarlos y envenenarlos con insecticidas. Al colocarlos después de la labranza y dado que no hay otra fuente de alimento en el campo, los insectos se dirigen a ellas. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.9 Control Químico

Se recomienda la fertilización foliar en las primeras etapas del cultivo y no después de la floración, es decir, 35, 60 y 80 días después de la siembra. Cuando el cultivo tenga 35 días fertilizar todo el follaje, a los 60 días ya los 80 días fertilizar el tercio inferior del cultivo. En la tercera aplicación, no debe superar los 700 L por hectárea. Se recomienda acefato (Orthene) 75 PS 2 g/l, profenofos (Curacron) EM 2,5 cc/l triflumuron (Alsystine) 1,5 cc/l. (Gallegos *et al.*, 2017)

8.10 Control biológico

El uso de enemigos naturales ha representado un aporte a la regulación de las poblaciones de plagas, ya que cuando se establecen en el ambiente, actúan naturalmente sobre su hospedero. (Lopez A. , 2004)

Se puede controlar con los hongos *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. Se consideran los patógenos más importantes para controlar adultos del gusano blanco. (Bastidas *et al.*, 2005)

8.11 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son el grupo más importante en el control biológico de plagas de insectos, presentes de forma natural en el ambiente, en suelos, residuos de cultivos, en cadáveres de insectos, tomando nutrientes de organismos u otra materia orgánica. Los hongos más utilizados son *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria brongniartii* (Ramírez *et al.*, 2014)

El modo de infección del hongo en el insecto comienza cuando el conidio entra en contacto con la cutícula del insecto susceptible, formando un tubo germinativo que permite al hongo ingresar al hemocele a través de una serie de enzimas que degradan la epidermis del huésped. Una vez dentro del cuerpo del insecto, el hongo comienza a invadir varios órganos, liberando toxinas que inhiben el crecimiento fisiológico y eventualmente matan al insecto. (INIA, 2017)

8.12 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Hasta la fecha se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos de insectos y continúa el aislamiento de nuevas cepas. Entre las especies más utilizadas a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33,9%), *Beauveria bassiana* (33,9%), *Isaria fumosorosea* (anteriormente *Paecilomyces fumosoroseus*) (5,8%) y *Beauveria brongniartii* (4,1%). (Cuenca, 2009)

El desarrollo de la enfermedad en los insectos se divide en tres etapas:

1. Adhesión y germinación de esporas en la epidermis del insecto.
2. Penetración en el hemocele.
3. Desarrollo del hongo. El resultado suele ser la muerte. insectos.

8.13 Factores que influyen en el desarrollo del hongo

Las cepas de *Beauveria bassiana* necesitan de las siguientes condiciones para su desarrollo:

Tabla 3: Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Factor	Descripción
pH	Entre 5.7 y 5.9
Temperatura	Óptima entre 25 a 28 °C; límite entre 8 y 35°C
Humedad	Óptima el 94%; límites entre 34 y 100% según la temperatura
Necesidad Nutricional	Fuentes de nitrógeno como peptona y fuentes de energía como sacarosa, glucosa, almidón, pectina.

Fuente: (Noboa y Quelal, 2015)

8.14 *Beauveria bassiana*

Este hongo fue descrito por primera vez por Jean Beauveria en 1911 como *Botrytis bassiana*. Luego, Vuillemin lo colocó en su categoría actual. Pruebas enzimáticas posteriores identificaron el género como *Beauveria spp.* y distinguieron seis especies: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* y *B. caledonia* (Noboa y Quelal, 2015)

8.15 Clasificación taxonómica

Según (Noboa y Quelal, 2015) la clasificación taxonómica es la siguiente:

Tabla 4: Taxonomía de *Beauveria bassiana*

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

Fuente: (Noboa y Quelal, 2015)

8.16 Morfología

Las características macroscópicas y microscópicas de *Beauveria bassiana* se describen a continuación.

8.16.1 Características macroscópicas

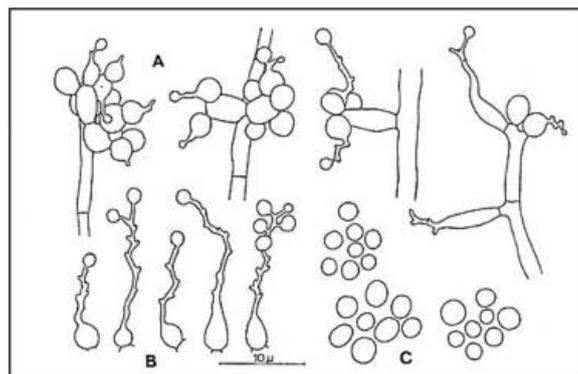
Crecen como un algodón blando al principio y luego toma un aspecto amarillento, con el paso de los días se vuelve de aspecto polvoriento y de color crema producto de las esporas. El reverso es blanco o amarillo pálido. (Noboa y Quelal, 2015)

8.16.2 Características microscópicas

La *Beauveria bassiana* es un hongo imperfecto, posee hifas septadas que contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos en los cuales se desarrolla las conidias. (Fernandez, 2020)

Las conidias son células haploides e hidrofóbicas, globosas y ovals de color blanco cremoso tiene estigmas alternados en zigzag alargados en su extremo distal llamado raquis. En cultivos sólidos el hongo produce conidias de forma esférica (1-3 μm de diámetro) u oval (1.5- 5.5x 1-3 μm). Las blastosporas no son tan infecciosas como las conidias. (Fernandez, 2020)

Gráfico 2: Estructura de *Beauveria bassiana*; a) aparato conidial, b) células conidiógenas, c) conidias.



Fuente: (Fernandez, 2020)

8.17 Desarrollo del hongo

En general, la penetración en el hemocele es un proceso rápido. Aquí el hongo convierte su crecimiento micelial en fase de levadura y una vez evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia ocasionada por la formación de cuerpos hifales secundarios que

invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, entre otras. (Fernandez, 2020)

Según (Fernandez, 2020) ha demostrado que el proceso de penetración desde la cutícula hasta el hemocele es favorecedor, debido a que la hifa queda inmersa en proteínas, quitinas, lípidos, melanina, di fenoles, carbohidratos, ya que este proceso favorece la nutrición y crecimiento del hongo.

Una vez que se ha producido la invasión y el hongo está dentro del insecto, éste debe enfrentarse a su sistema inmunológico, producir toxinas o cambiar la estructura en sus paredes celulares, la *Beauveria bassiana* secretada produce sustancias tóxicas como beauvericina, beauverólidos y basianólidos, las cuales destruyen completamente el sistema del insecto causando convulsiones, falta de coordinación, cambios de comportamiento y parálisis. (Noboa y Quelal, 2015)

Cuando el huésped muere, la *Beauveria bassiana* continúa creciendo dispersándose por los tejidos del insecto y compitiendo con su microbiota. En esta etapa se observó un característico cadáver rojo, producido por la oosporeina, un antibiótico específico para la secreción de *B. bassiana*. Luego, el cadáver fue completamente momificado y cubierto con micelio. (Noboa y Quelal, 2015)

8.18 PAPA (*Solanum tuberosum*)

La papa es una planta herbácea, su hábito de crecimiento varía dependiendo de las especies y dentro de cada especie. Cuando todas las hojas (o casi todas) se encuentran cerca de la base o en la base de tallos cortos, y están cerca del suelo, se dice que la planta tiene hábito de crecimiento arrosetado o semi arrosetado. (Torres *et al.*, 2011)

8.18.1 Taxonomía y Morfología de la papa

Tabla 5: Papa (*Solanum tuberosum*)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>S. Tuberosum</i>

Fuente: (Guirola y Valdés, 2009)

El tallo, grueso, fuerte, anguloso, con una altura que varía entre 0,5 y 1 m, se origina en las yemas del tubérculo. Las hojas son imparipinnadas. Consta de nueve o más folíolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción. El fruto es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar (Guirola y Valdés, 2009)

8.19 Sustrato

8.19.1 Tierra Negra

La tierra negra es de color oscuro y es el resultado de la descomposición de la materia orgánica, ya sea de cadáveres de animales o de restos de hojas caídas, que se absorben como nutrientes. Cuando hablamos de las propiedades del suelo negro podemos referirnos a que contiene materia orgánica que se ha descompuesto en partículas muy pequeñas, mejora su textura al darle la capacidad de retener suficiente agua y también proporciona buena circulación entre las raíces de las plantas, fundamental para su crecimiento. (Portal Frutícola, 2019)

8.19.2 Turba

La turba es uno de los sustratos más utilizados para las plantas y aunque es muy pobre en nutrientes como el nitrógeno, sus propiedades son ideales para el crecimiento y crecimiento de la gran mayoría de especies vegetales. La turba es uno de los materiales de sustrato más utilizados en la horticultura y la agricultura. Todos hemos oído hablar de este tipo de suelo, es muy utilizado en la mayoría del caso en jardinería. (Acosta, 2021)

Capítulo III

9. HIPÓTESIS

9.1 Hipótesis Nula= H0

Con la aplicación de al menos una de las concentraciones de *Beauveria bassiana* se logrará la mortalidad del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*)

9.2 Hipótesis Alternativa =H1

Con la aplicación de al menos una de las concentraciones de *Beauveria bassiana* no se logrará la mortalidad de gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*)

10. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

10.1 Localización del ensayo

Este ensayo se realizó en el barrio Salache, parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga, en la provincia de Cotopaxi en el laboratorio de Microbiología de la carrera de Agronomía perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales perteneciente a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Gráfico 3: Ubicación del proyecto



Fuente:(Google Earth, 2022)

10.2 Tipo de Investigación

10.2.1 Experimental

Esta investigación es experimental, consiste en hacer cambios en el valor de una o más variables independientes, para el diseño de este proyecto tenemos como variables independientes las dosis de concentración de *Beauveria bassiana* que permitirá observar su efecto en la variable dependiente que es capacidad de adaptación.

Se aplicará un diseño experimental de bloques completamente al azar (DBCA) obteniendo siete tratamientos incluido el testigo con cuatro repeticiones.

10.2.2 Cualitativa- Cuantitativa

Recibe el nombre de cualitativo porque describe los sucesos complejos en su medio natural y cuantitativo porque se tomó datos los cuales incluye mediciones sistemáticas ya que se empleará un análisis estadístico en el programa Infostat.

10.3 Modalidad básica de investigación

10.3.1 Campo

Esta investigación es de campo, ya que se recopilan datos durante la vida de la plaga, este proceso nos permite recopilar nuevos conocimientos en campo para luego vincularlos a la realidad de los productores afectados por esta plaga.

10.3.2 Laboratorio

La investigación es de fase laboratorio porque se lleva a cabo en un ambiente controlado (tipo laboratorio) donde se aplican diferentes técnicas y reactivos para obtener valores cuantitativos de los componentes como biológicos, orgánicos, etc.

10.3.3 Bibliográfica

El estudio tuvo un proceso de recopilación de datos consistente para construir el proyecto, y se implementó un proceso de abstracción científica.

10.4 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

10.4.2 Observación de campo

Esto permitió tener contacto directo con el objeto en estudio para una recopilación de los respectivos datos.

10.4.3 Registro de datos

Se registró los datos en una libreta de campo en la cual se apuntó los respectivos resultados.

10.4.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante la investigación se tabularon y se realizó el análisis estadístico con el programa Infostat.

10.5 MATERIALES Y EQUIPOS

10.5.1 Material biológico

- Larvas de gusano blanco
- Cepas de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*)
- Tubérculos de papa “variedad uvilla”

10.5.2 Materiales de campo

- Libreta de campo
- Bolígrafos
- Lápiz
- Cinta métrica
- Cinta adhesiva
- Ligas
- Mallas
- Bandejas de aluminio

10.5.3 Materiales de oficina

- Papel bond
- Laptop

10.5.4 Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Frascos de laboratorio 50,100,500 ml
- Probetas 50,1000 ml
- Pinzas entomológicas
- Estuche de disección
- Láminas porta objetos
- Láminas cubre objetos
- Vasos de precipitación 50,100, 200 ml
- Mechero
- Matraces de Erlenmeyer 50, 100, 200 ml
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas 100, 200 ul
- Gradilla
- Mandil
- Guantes de laboratorio
- Papel
- Azas
- Marcadores para rotular

10.5.5 Insumos y reactivos

- Medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar)
- Gentamax
- Alcohol al 90
- Papel parafilm
- Plástico film
- Agua destilada

10.5.6 Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Microscopio

- Vortex
- Refrigeradora
- Cámara de Neubauer
- Autoclave
- Balanza
- Agitador magnético de laboratorio
- Estereoscopio

10.6 Diseño experimental

10.6.1 Unidad Experimental

En cada unidad experimental se colocó 15 larvas del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) en su primer instar larval con 5 tubérculos de la variedad uvilla, ubicados en bandejas de aluminio con 500 gramos del sustrato (tierra negra + turba) esterilizada y no esterilizada.

10.7 Factores de estudio

Factor A: Dosis de concentración

- A1: Concentración 10^8
- A2: Concentración 10^9
- A3: Concentración 10^{10}

Factor B: Sustratos

- B1: Esterilizada
- B2: No esterilizada

10.8 Tratamiento en estudio

Se presenta los tratamientos que serán empleados en el ensayo experimental

Tabla 6: Tratamientos, códigos, descripción

Tratamiento	Códigos	Descripción
T1	A1B1	10^8 conidios ml-L / Esterilizada
T2	A1B2	10^8 conidios ml-L /No Esterilizada
T3	A2B1	10^9 conidios ml-L / Esterilizada
T4	A2B2	10^9 conidios ml-L /No Esterilizada
T5	A3B1	10^{10} conidios ml-L /Esterilizada
T6	A3B2	10^{10} conidios ml-L /No Esterilizada
T7	A0B0	Adicional

10.8.1 Distribución del ensayo

Tabla 7: Diseño de Bloques Completamente al Azar

R1	R2	R3	R4
T1(A1B1)	T7(A0B0)	T6(A3B2)	T5(A3B1)
T2(A1B2)	T6(A3B2)	T7(A0B0)	T4(A2B2)
T3(A2B1)	T5(A3B1)	T4(A2B2)	T7(A0B0)
T4(A2B2)	T4(A2B2)	T5(A3B1)	T6(A3B2)
T5(A3B1)	T3(A2B1)	T2(A1B2)	T1(A1B1)
T6(A3B2)	T2(A1B2)	T1(A1B1)	T3(A2B1)
T7(A0B0)	T1(A1B1)	T3(A2B1)	T2(A1B2)

10.9 ADEVA

Tabla 8: Cuadro adeva

F.B	GL
Repeticiones	3
Tratamientos	6
Facto A	2
Factor B	1
Factor A*B	2
Tratamientos vs Adicional	1
Error	18
Total	27

10.10 Operación de variables

Tabla 9: Definición de variables e indicadores

TIPO VARIABLE	DE NOMBRE	INDICADOR	ÍNDICE
DEPENDIENTE	Mortalidad	Mortalidad del gusano blanco de la papa	% de mortalidad de las larvas
INDEPENDIENTE	<i>Beauveria bassiana</i>	Concentración de conidios 10^8 , 10^9 , 10^{10}	Dosis de 10ml por unidad experimental

10.11 Manejo específico del experimento

Esta investigación consta de las siguientes fases:

10.11.1 Fase de recolección de larvas de gusano blanco de la papa.

Se realizó la captura de las larvas, el cual se adaptó el método de “colección de larvas”, para este método se realizó la visita a diferentes cultivos de cosecha de productores de papas, se recolectaron tubérculos infestados con larvas, estas muestras fueron recolectadas en el cantón Pujilí, barrio Luis Felipe Chávez, fueron acondicionadas en un costal con papa infectada y poca tierra, para después ser trasladada al laboratorio de microbiología en el Campus Salache perteneciente a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Gráfico 4: Ubicación geográfica del lugar donde se recolectaron las larvas



Fuente: (Google Earth, 2022)

Tabla 10: Datos geográficos de la recolección

Lugar de colecta	Altitud (m.s.n.m)	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
Cantón Pujilí barrio Luis Felipe Chávez	2.996	0°57'01.9"S	78°41'39.0"W

10.11.2 Fase de laboratorio

10.11.2.1 Medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) se realizó de la siguiente manera

La cantidad correspondiente de agua destilada es de: 100ml para 5 cajas Petri

- 1) En un frasco de vidrio tomamos 400 ml de agua destilada.
- 2) En la balanza digital pesamos 15,6 gramos de PDA, la cual pasamos al frasco de vidrio y mezclamos los 400ml de agua destilada con los 15,6 gramos de PDA.
- 3) Agitamos el frasco de vidrio hasta obtener una muestra homogénea.
- 4) Llevamos el frasco de vidrio hasta la autoclave para esterilizar la mezcla a 35°C por 35 minutos.

- 5) Al terminar la esterilización sacamos el frasco de vidrio, se dejó que la temperatura llegue a 21 °C y se aplicó antibiótico Gentamax.
- 6) Se utiliza 50µl de Gentamax por cada 100ml la mezcla, tomar en cuenta que la mezcla del medio de cultivo no tiene que estar muy caliente ya que esto provoca que el antibiótico bajara su efectividad.
- 7) La utilización de la ampolla de gentamax es para evitar la contaminación de bacterias en el medio de cultivo este proceso es realizado en la cámara laminar.
- 8) Vertimos la solución a las respectivas cajas Petri y dejar solidificar.

10.11.2.2 Método de multiplicación

Esta fase se realizó con el método de (Ramírez *et al.*, 2017) basado desde un cultivo monoespórico para multiplicar *Beauveria bassiana*.

Se realizó los siguientes pasos:

- 1) Se preparó medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar), se procedió a llevar a la autoclave al terminar dejamos el medio de cultivo en la cámara laminar.
- 2) Cuando el medio de cultivo está en una temperatura de 21° se procedió a poner el antibiótico gentamax.
- 3) En papel aluminio envolvemos azas, pinzas, porta bisturí, puntas de micropipeta y esterilizamos 35 minutos, al terminar lo dejamos en la cámara laminar.
- 4) Procedemos a limpiar la cámara laminar con hipoclorito de sodio y alcohol.
- 5) En un vaso de precipitación ponemos agua destilada, en otro vaso de precipitación dispensamos alcohol, esto lo llevamos a la cámara laminar incluyendo el mechero, esto nos sirvió para flamear el bisturí y evitar contaminación.
- 6) En las cajas Petri vertemos el medio de cultivo y dejamos solidificar.
- 7) Seleccionamos la mejor muestra de *Beauveria bassiana*, está la llevamos a la cámara laminar, hicimos cortes con el bisturí en cuadrados, seleccionando donde mejor está el micelio, con una pinza la pasamos a las cajas Petri con el medio de cultivo ya solidificado.
- 8) Se procedió a sellar las cajas con papel parafilm, con un bolígrafo marcamos la caja Petri esta debe tener los siguientes datos: fecha y nombre del hongo, después sellamos con plástico film y lo llevamos a la incubadora a unos 25°.
- 9) Finalmente, durante los 7 días se observó las cajas Petri cubiertas de *Beauveria bassiana*.

10.11.2.3 Método para el conteo de UFC (Unidad formadora de colonias)

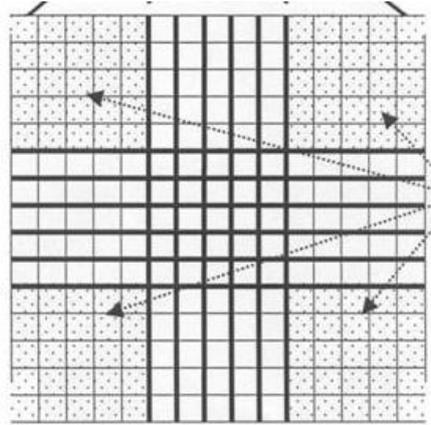
Siguiendo el protocolo de (Sánchez *et al.*, 2017) esta consiste en hacer diluciones seriadas 1:10 y extender 0.1 mL de cada dilución en una placa; las placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento.

- 1) Elegimos la caja Petri con *Beauveria bassiana* con la cual vamos a realizar el conteo.
- 2) En la caja Petri donde está el hongo de *Beauveria bassiana* colocamos agua destilada.
- 3) Con una aza raspamos el hongo.
- 4) En un vaso de precipitación colocamos la solución del hongo que raspamos.
- 5) Colocamos 4 tubos de ensayo cada tubo con 9 ml de agua destilada esterilizada.
- 6) Tomamos 1 ml de la solución madre, procedemos a poner en el primer tubo de ensayo con el vortex agitamos unos 4 minutos, del primer tubo de ensayo tomamos 1ml; lo ponemos al segundo tubo de ensayo procedemos a agitar, realizamos el mismo procedimiento hasta llegar al último tubo de ensayo.
- 7) Con la micropipeta obtenemos 1 ml del último tubo de ensayo mezclado con el agitador vortex.
- 8) Colocamos la muestra en la cámara de Neubauer y la cubrimos.
- 9) La muestra la colocamos en el microscopio y observamos.
- 10) Ya enfocada la muestra procedemos a observar los cuadrantes los cuales deben contener conidios los cuales se procedió a contar.

10.11.2.4 Concentración de conidios (Cuantificación en la cámara de Neubauer)

Se siguió el protocolo de (Focosi, 2014)

- 1) Con una micropipeta de 100 μ l se extrae la solución de la muestra madre.
- 2) Se traslada la muestra a la cámara de Neubauer, se coloca el cubre objetos y por efecto de la capilaridad se llena los cuadrantes de la cámara.
- 3) Se lleva la muestra al microscopio y se observa con el lente que mejor se pueda visualizar los conidios.
- 4) Contar los cuadrantes de las esquinas donde como se muestra en la imagen señaladas con las flechas.



Fuente: (Focosi, 2014)

Para identificar unidades formadoras de colonias se tomó la metodología de (Ramos, 2017)

$$\text{Conteo de esporas} = \frac{N^{\circ} \text{ de células} \times 10000}{N^{\circ} \text{ de cuadros} \times \text{disolución}}$$

Donde:

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros.

El número de cuadros son los cuadros donde hemos hecho el recuento.

Disolución por el número de disoluciones que utilizamos.

10.11.2.5 Elaboración de la solución madre

Siguiendo la metodología de (Gómez *et al.*, 2014) menciona, para realizar la solución madre se utiliza agua destilada estéril y el hongo entomopatógeno de *Beauveria bassiana*.

1. Se selecciona las mejores cajas Petri con *Beauveria bassiana* observando que su esporulación sea la adecuada para utilizar, para la solución de 10^8 se utilizó 11 cajas, para la solución de 10^9 conidios/ml se utilizó 14 cajas y para la solución 10^{10} conidios/ml se utilizaron 17 cajas.
2. En un vaso de precipitación obtenemos agua destilada, la cual vertemos en poca cantidad sobre las cajas Petri.
3. Con una aza procedemos a limpiar el hongo que se encuentra en la caja Petri.
4. La mezcla del agua destilada estéril con el hongo lo depositó sobre una probeta aforando a los 240 ml.
5. Se procedió a mezclar la concentración con el agitador magnético de laboratorio.

6. Este proceso lo realizamos para todas las concentraciones.

10.12 Implementación del diseño experimental

10.12.1 Esterilización de sustratos

Materiales

- Autoclave
- Recipientes de aluminio
- Papel aluminio
- Sustrato (Tierra Negra + Turba)

Procedimiento:

1. Se mezcló la tierra negra con la turba creando una mezcla homogénea.
2. En las bandejas de aluminio llenamos el sustrato
3. Con el papel aluminio cubrimos la parte superior de la bandeja creando una especie de tapa.
4. Procedimos a colocar las bandejas de aluminio en la autoclave por unos 45 minutos para así esterilizar el sustrato.

10.12.2 Desinfección de larvas

Materiales

- Larvas de gusano blanco de la papa
- Probeta
- Agua destilada
- Cloro
- Papel de cocina

Procedimiento:

- 1) En una probeta se colocó 95 ml de agua destilada, con 0.5 aforamos para llegar al 100%.
- 2) Con el hipoclorito de sodio al 0.5% procedemos a lavar las larvas de gusano blanco de la papa.
- 3) En el hipoclorito de sodio se dejó por 1 minuto a las larvas.
- 4) Se procedió a sacar las larvas y se las colocó en el papel de cocina para secarlas.

10.12.3 Rotulado de las bandejas

Con papel adhesivo y un bolígrafo se procedió a poner los diferentes códigos de tratamientos y repeticiones a las bandejas.

10.12.4 Acondicionamiento de gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*)

En la ejecución de esta fase se adaptó la metodología utilizada por (Pérez *et al.*, 2009) se realizaron algunas modificaciones para el acondicionamiento del gusano blanco de la papa.

Materiales

- Sustrato (Tierra negra + Turba) Esterilizado
- Sustrato (Tierra negra + Turba) Sin Esterilizar
- Larvas del gusano blanco de la papa desinfectados
- Bandejas de aluminio 24x17
- Rótulos con los diferentes códigos
- Tubérculo de papa (Variedad uvilla)

Procedimiento:

1. Primero se colocó 500 g de sustrato en las bandejas de aluminio.
2. Se procedió a humedecer el sustrato con un frasco aspersor.
3. Se colocó en cada bandeja 15 larvas del gusano blanco de la papa.
4. Luego se empleó los tubérculos de papa “Variedad uvilla” 5 por cada unidad experimental, sirviendo este como alimento para los gusanos.

10.13 Aplicación de *Beauveria bassiana*

La aplicación de *Beauveria bassiana* se realizó de la siguiente manera:

Materiales

- Solución madre
- Vasos de precipitación
- Frasco aspersor pequeño

Procedimiento:

- 1) En el frasco de aspersión pequeño colocamos 10 ml de la solución madre *Beauveria bassiana*.

- 2) Se procedió a fumigar en cada unidad experimental guiándonos por el tratamiento plateado en el ensayo.
- 3) Se realizó este procedimiento para cada uno de los tratamientos.

10.14 Datos a evaluar

10.14.1 Mortalidad de larvas

Se realizó el conteo de las larvas muertas después de haber aplicado *Beauveria bassiana* esto se ejecutó por cada unidad experimental, se contabilizó las larvas retirando cuidadosamente el sustrato y los tubérculos, se llevó un registro de datos cada 3 días durante toda la investigación, la aplicación de las concentraciones de *Beauveria bassiana* se realizó durante un mes cada 5 días.

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo del % de mortalidad:

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

Para identificar la muerte del insecto se colocó la larva en un medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar), se lo llevo a la incubadora y así determinar que murió por *Beauveria bassiana*.

10.5 Análisis estadístico

Se utilizó el software INFOSTAT para la obtención de análisis de varianza y pruebas de tukey al 5% para los factores en estudio y también con el programa de Excel para el análisis de los resultados obtenidos por medio de las hojas de cálculo ajustadas con las funciones necesarias para la investigación y elaboración de gráficas.

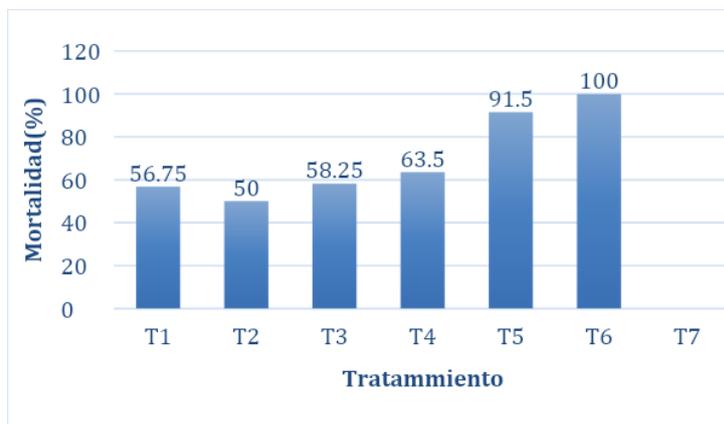
CAPÍTULO IV

11. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

11.1 ANÁLISIS DE MORTALIDAD

En las siguientes tablas se presentan los datos de mortalidad de *Premnotrypes vorax* controladas con *Beauveria bassiana* en diferentes concentraciones bajo condiciones de laboratorio.

Gráfico 5: Porcentaje de mortalidad total de los tratamientos



En el grafico #, se observa la mortalidad de los tratamientos, siendo el tratamiento T6(Sin esterilizar con concentración 10^{10}), el mayor porcentaje con un 100% mientras que el tratamiento 7 (Testigo) obtuvo un 0 % de mortalidad.

Cuadro 1: Análisis de la Varianza para la variable mortalidad.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Repeticiones	1052,86	3	350,95	6,86	0,0028n.s
Tratamientos	25272,5	6	4212,08	82,35	<0,0001 **
FACTOR A					
(Concentraciones).	8181,75	2	4090,88	37,31	<0,0001 **
FACTOR B (sustrato)	32,67	1	32,67	0,3	0,5919n.s
FACTOR A *B					
(Concentraciones).	258,08	2	129,04	1,18	0,3308n.s
FactorialvsTestigo	16800	1	16800	328,47	<0,0001 **
Error	920,64	18	51,15		
Total	27246	27			
CV%					11,92

En el cuadro #1 del análisis de porcentajes de mortalidad para los tratamientos se observa que si existe diferencias altamente significativas para el Factor A (concentraciones), para los tratamientos y el testigo vs los tratamientos. En la investigación se obtuvo un coeficiente de

variación de 11,92% lo que se interpreta que existió un correcto manejo de las unidades experimentales durante toda la fase de estudio.

Cuadro 2: Prueba de Tukey para tratamientos.

Tratamientos	Medias		
6	100A		
5	91,5A		
4	63,5	B	
3	58,25	B	
1	56,75	B	
2	50	B	
7	0		C

En el cuadro 2, se observa la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos donde los resultados muestran tres rangos de significancia estadísticos, teniendo al Tratamiento 6 (Sin esterilizar con concentración de 10^{10} conidios /ml), en el rango A con una media de 100% de mortalidad siendo el mayor, (Lucero *et al.*, 2004) sustentan con una investigación que trata de la evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae) muestra que los aislamientos que presentaron mayor actividad biocontroladora a nivel de laboratorio fueron los aislamientos Mt1, Mt2 y Bb cosmo, los cuales arrojaron porcentajes de mortalidad acumulada de 100% a la concentración de 1×10^{10} conidios /ml , resultados obtenidos para el tratamiento T5(Sin esterilizar con concentración de 10^{10} conidios /ml) son similares con los datos obtenidos por (Torres Rocio, 1997) donde obtiene un dato de mortalidad del 91,5% de acuerdo con los resultados de este trabajo ,las cepas de *B.bassiana* brindan amplias perspectivas para el control microbiológico del “gusano blanco de la papa” en condiciones de campo.

Para la concentración de 1×10^8 conidios /ml de suelos sin esterilizar (T2) se obtuvo un 50% de mortalidad de *Premnotrypes vorax* similar a los resultados obtenidos por (Rivera y Pinto, 2001) en el cual uno de los aislamientos Bb9728 presentó mortalidades mucho menores en las dos primeras fases de evaluaciones, alcanzando un máximo de 56% de mortalidad con la concentración más alta (1×10^8 e/ml)

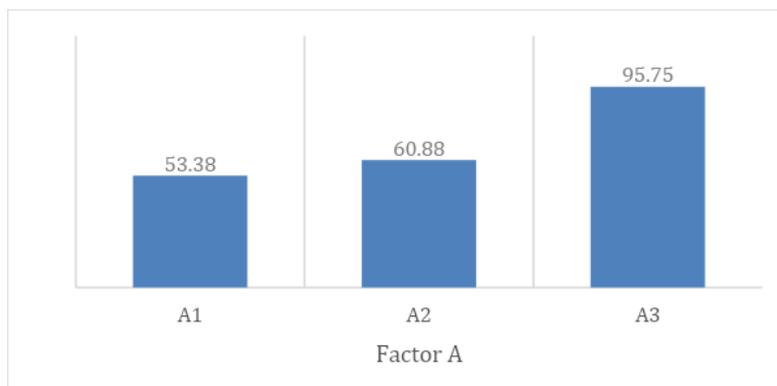
Las concentraciones 10^8 , 10^9 y 10^{10} conidios /ml de *Beauveria bassiana* causan la muerte del gusano blanco de la papa aumentando la mortalidad conforme aumenta la concentración de aplicación del hongo entomopatógeno empleado.

Cuadro 3: Prueba de Tukey para el factor A

FACTOR A				
(Concentraciones).	Medias	n	E.E.	
3	95,75	8	3,7A	
2	60,88	8	3,7	B
1	53,38	8	3,7	B

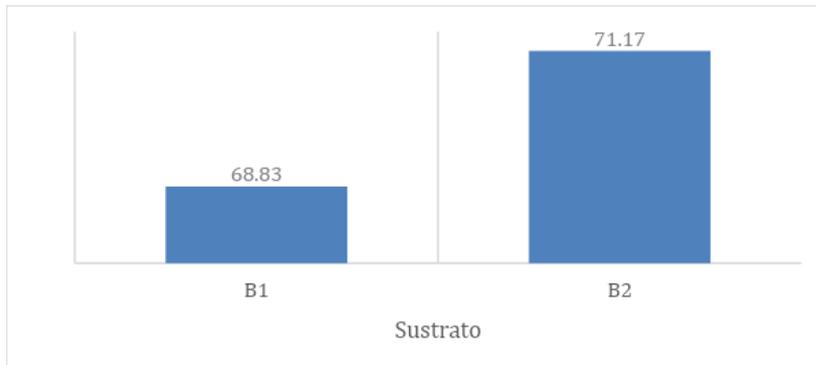
Fuente: (Caillagua, 2022)

En el cuadro 3, se observa que tenemos dos rangos de significancia estadística donde, la concentración 1×10^{10} conidios /ml con una media de 95.75% siendo la mayor, mientras que la concentración 1×10^8 conidios /ml se ubica en el rango B con una media de 53,38% siendo el menor.

Gráfico 6: Prueba de Tukey para el Facto A**Cuadro 4:** Prueba de Tukey para el Factor B

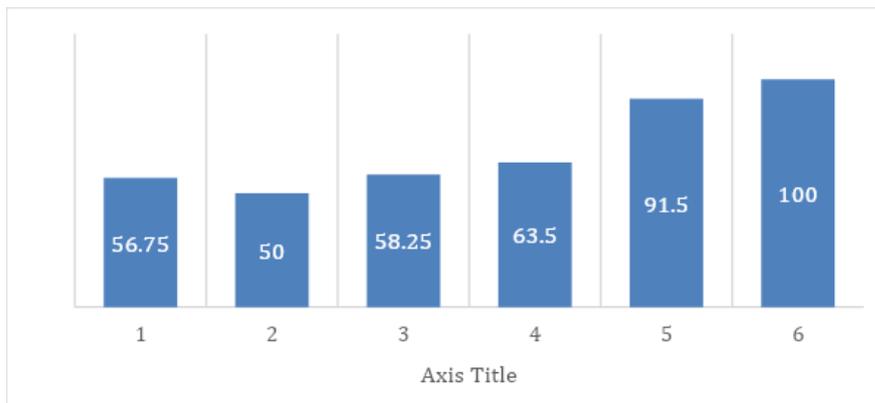
FACTOR B (sustrato)	
	Medias
2	71,17A
1	68,83A

En el cuadro 4, se observa que tenemos un rango de significancia estadística, lo que se interpreta que no existió diferencia en la utilización de un suelo esterilizado con un suelo no esterilizado, lo que nos indica que el Factor B depende del Factor A (Concentraciones).

Gráfico 7: Prueba de Tukey Factor B**Cuadro 5:** Prueba de Tukey para Factor A*B

FACTOR A (Concentraciones)..	FACTOR B (sustrato)	Medias	
3	2	100A	
3	1	91,5A	
2	2	63,5	B
2	1	58,25	B
1	1	56,75	B
1	2	50	B

En el cuadro 5, se observa que tenemos dos rangos de significancia estadística donde, el suelo no esterilizado con A3 (Concentración 10^{10}) se encuentra en el rango A con una media de 100% siendo el mayor rango, después sigue el suelo esterilizado con A3(Concentración 10^{10}) se ubica de igual manera en el rango A y por ultimo tenemos al suelo no esterilizado con A1 (Concentración 10^8) con una media de 50% de mortalidad.

Gráfico 8: Prueba de Tukey para Factor A*B

CAPÍTULO V

12. CONCLUSIONES

- Se determinó que la mejor concentración fue 10^{10} conidios /ml para controlar *Premnotrypes vorax*.
- Se identificó que no existió diferencia significativa entre los sustratos (esterilizado y no esterilizado) para el control del gusano blanco de la papa en condiciones de laboratorio, así se demostró que *Beauveria bassiana* no depende del sustrato.
- El tratamiento seis fue el mejor con la aplicación de *Beauveria bassiana* con una concentración 10^{10} conidios /ml, con el sustrato no Esterilizado obteniendo un 100 % de mortalidad de *Premnotrypes vorax*.

13. RECOMENDACIONES

- Limpiar correctamente los equipos de laboratorio para evitar contaminación del hongo entomopatógeno en estudio.
- Difundir el uso de *Beauveria bassiana* para el control biológico del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) evitando así el uso excesivo de plaguicidas.
- Realizar nuevos estudios con *Beauveria bassiana* probando con la concentración 10^{10} conidios /ml en un cultivo de papa en condiciones de laboratorio.

14. PRESUPUESTO

Tabla 11: Presupuesto de la investigación

Actividad 1					
Rubro General	Detalle	Tamaño	Canti dad	Costo Unitari o	Costo Total
Compra de Beauveria bassiana (Cepa Madre)	Cepa madre	Mediana	1	25	25
Multiplicar Beauveria bassiana	Cajas Petri de plástico	Mediana	200	0,25	44
	Medio de cultivo PDA	Pequeño	1	80	80
	Papel Parafilm	Pequeño	1	67	67
	Marcador	Mediano	1	0,80	0,80
	Antibiótico Gentamax 280	Mediana	9	1,25	11,25
	Papel Aluminio	Mediano	3	1,25	3,75
	Plástico de cocina	Mediano	1	3,60	3,60
	Subtotal Actividad				235,4 0
Objetivo 2					
Actividad 1					
Rubro General	Detalle	Tamaño	Canti dad	Costo Unitari o	Costo Total
Conteo UFC	aza	Mediana	1	3,00	3,00

	tubos de ensayo	pequeños	5	0.90	4,5
Insumos	Bandejas de aluminio de	Mediana	28	0,83	23,24
	Tierra Negra	Quintal	1	2.50	2,50
	Turba	libras	40	0,35	14
	Papas infectadas de larvas (gusano blanco de la papa)	Quintal	2	4,00	8,00
	Papa chola	Arroba	1	7,00	7,00
	Subtotal de Actividades				62,24
Actividad 2					
Toma de datos e identificación de <i>Beauveria bassiana</i>	Libreta	A4	1	1,25	1,25
	Cajas Petri	pequeño	28	0,25	7
	Esfero	Mediano	1	0,50	0,50
	Subtotal de Actividades				8,75
Actividad 3					
Rubro General	Detalle				Tamaño
Transporte	Bus	Integrante s	1	0,30	20,00
	Subtotal Actividad				20,00
				TOTAL	326,39

15.BIBLIOGRAFIA

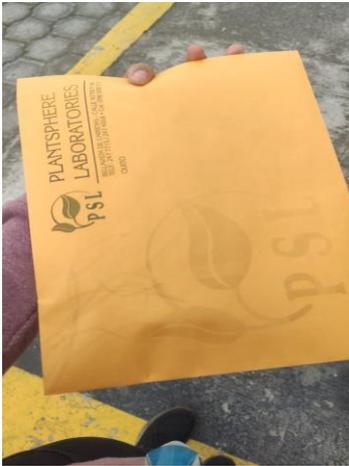
- Agroasemex. (2019). *Gobierno de México*. Obtenido de <https://www.gob.mx/agroasemex/articulos/las-plagas-producen-perdidas-de-hasta-un-40-por-ciento-en-la-produccion-agricola-revela-estudio-de-la-fao>
- Barrera, & Crisman. (1999). *International Potato Center*. Obtenido de <https://cipotato.org/papaenecuador/manejo-de-gusano-blanco/manejo-integrado/>
- Bastidas, S., Morales, P., Pumisacho, M., Gallegos, P., Heredia, G., & Benitez, J. (2005). *Guia de aprendizaje para pequeños agricultores*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3256/1/iniapscCD51..pdf>
- Cuenca, A. (2009). *scielo*. Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000200007
- Fernandez, J. (2020). *Repositorio ups*. Obtenido de Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus ham*): <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19620/1/UPS-CT008915.pdf>
- Focosi, D. (2014). *Molecular Medicine*. Obtenido de <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/hemocitometro.htm>
- Gallegos , P., Avalos, G., & Castillo, C. (1997). *Iniap*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3257/1/iniapsc144.pdf>
- Gallegos, P., Torres, L., Castillo, C., & Asaquibay, C. (16 de Octubre de 2017). *International Potato Center*. Obtenido de <https://cipotato.org/papaenecuador/2017/10/16/habitos-del-insecto/>
- Gómez , H., Zapata, A., Torres Del Aguila, E., & Tenorio, M. (2014). Manual de produccion y uso de hongos entomopatogenos. *SENASA*, 1-37.
- Guirola, V., & Valdés, R. (2009). *Monografias.com*. Obtenido de <https://www.monografias.com/trabajos93/cultivo-papa/cultivo-papa>

- Huraca, H., & Gallegos, P. (2012). *Iniap*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5135/1/iniapsc365.pdf>
- INIA. (2017). *Cambridge Dictionary | English Dictionary, Translations & Thesaurus*. Obtenido de Hongos entomopatógenos: <https://www.inia.cl/bioinia/hongos-entomopatogenos/>
- Iniap. (1999). *Iniap*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/41/1/iniapsc181.pdf>
- Iniap. (2014). *Iniap*. Obtenido de <http://www.tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mraiz/rpapa>
- Lopez, A. (2004). *AgriPerfiles*. Obtenido de <https://agriperfiles.agri-d.net/display/AS-pub-7C067773D4C8CCE8C3DC6CB5B1CA6324>
- Lopez, V. (2019). *Iniap*. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5373/1/iniapsc382bb.pdf>
- Lucero Mafla, A. M., Peña Villamil, L. A., & Bacca, T. (2004). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *REVISTA CORPOICA*, 5, 1-6.
- Noboa, G., & Quelal, A. (2015). *Repositorio ups*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>
- Peña, L., & Bolaños, M. (1997). *Biblioteca Digital - Agronet*. Obtenido de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6445/1/Manejo%20integrado%20del%20gusano%20blanco%20de%20la%20papa.pdf>
- Perez, J., & Merino, M. (2021). *Definición.de*. Obtenido de <https://definicion.de/eficacia/>
- Ramirez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (s.f.). *Produccion de hongos entomopatógenos*. Obtenido de senasa: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>
- Rivera, G., & Pinto, L. (2001). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1-13.
- Salamanca, F., & Vélez, R. (2013). *CropLife Latin America*. Obtenido de <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/gorgojo-de-los-andes>

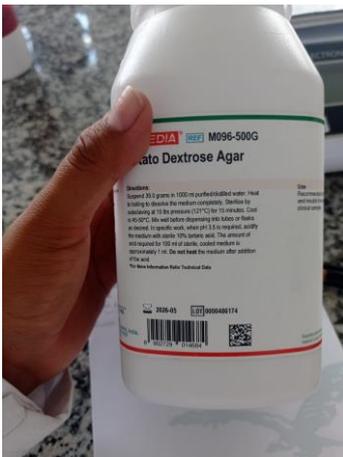
- Sánchez, E., Núñez, D., Cruz , R., Torres, M., & Herrera, E. (2017). Simulación y Conteo de Unidades. *ReCIBE. Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, 97-111.
- Torres, L., Gallegos , P., Castillo , C., & Asaquibay, C. (2011). *International Potato Center*. Obtenido de International Potato Center
- Yara. (2022). *Yara*. Recuperado el 2022, de <https://www.yara.com.ec/nutricion-vegetal/papa/la-produccion-mundial-de-papas/#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20global%20de%20papas,y%2071%20milliones%20de%20toneladas>.

16.ANEXOS

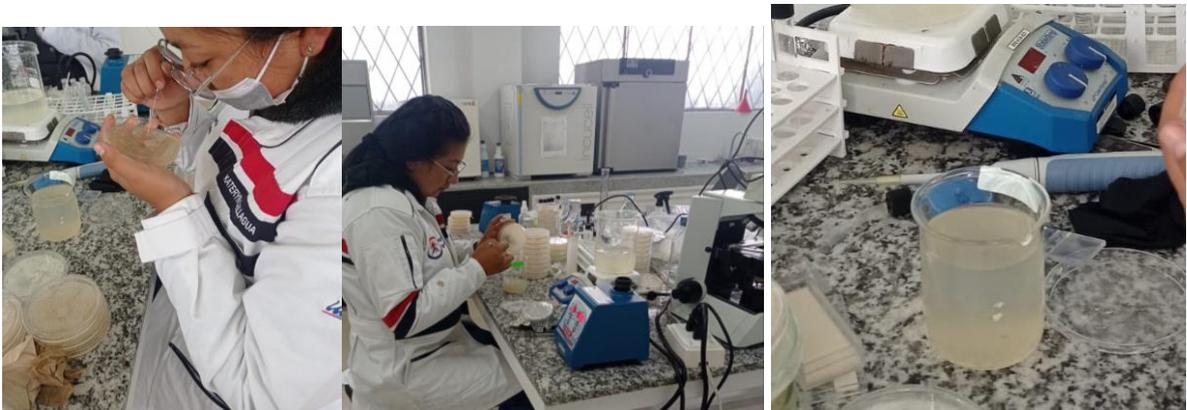
Anexo 1: Adquisición de cepa madre de *Beauveria bassiana*



Anexo 2: Multiplicación de *Beauveria bassiana*



Anexo 3: Esterilización del sustrato**Anexo 4: Implementación del ensayo****Anexo 5: Colocación de larvas de *Premnotrypes vorax***

Anexo 6: Implementación de tubérculos en las unidades experimentales**Anexo 7:** Elaboración de solución madre**Anexo 8:** Conteo de conidios para la elaboración de las concentraciones

Anexo 9: Aplicación de las concentraciones de *Beauveria bassiana*

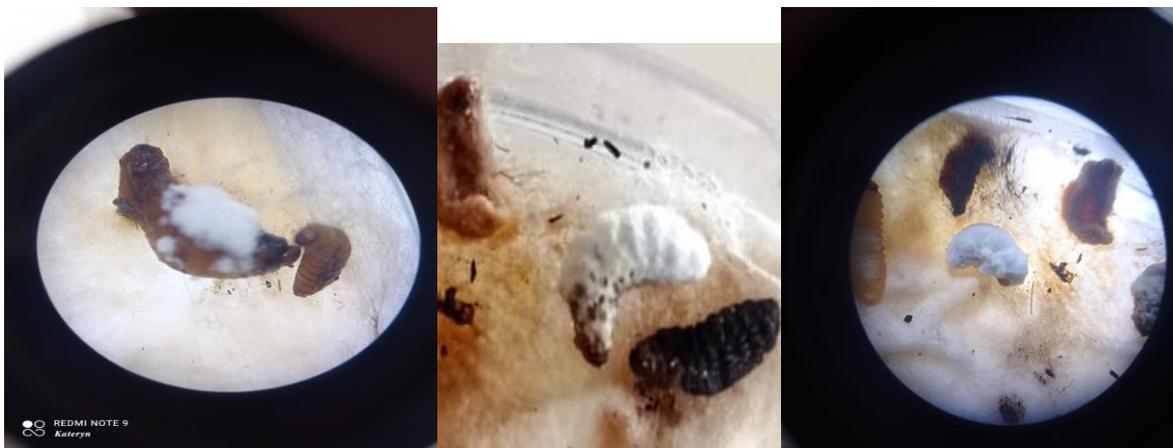


Anexo 10: Registro de mortalidad del gusano blanco de la papa

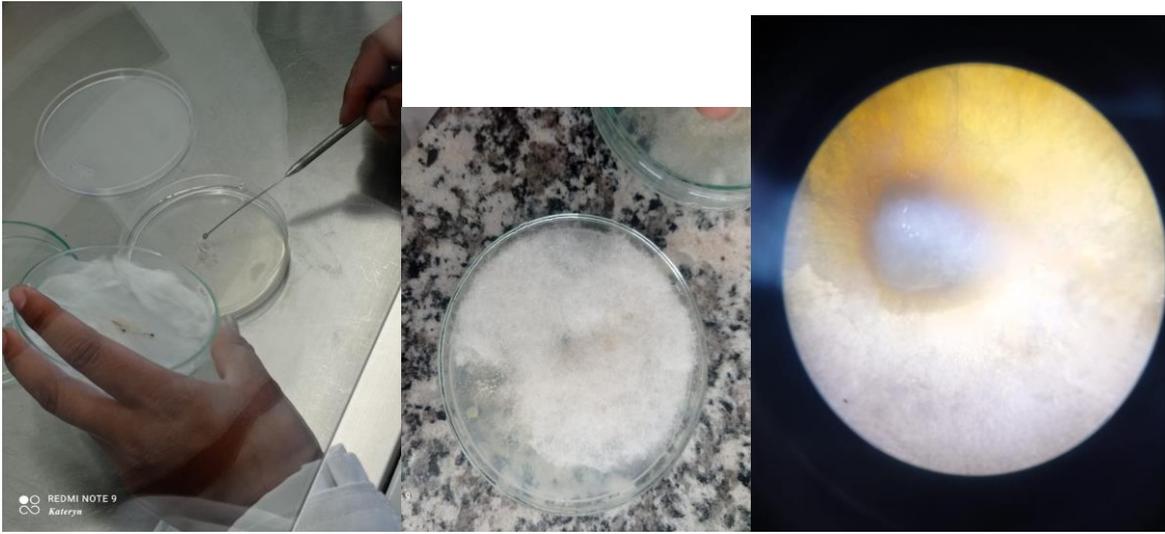
TEMA: "EVALUACIÓN DE *Beauveria bassiana* A PARTIR DE UN CULTIVO MONOSPORICO EN GUSANO BLANCO DE LA PAPA (*Premnotrypes vorax*) EN CONDICIONES DE LABORATORIO, SALA
FECHA DE APLICACION: 20 de junio del 2022

N°	Repetición	Tratamiento	Tratamiento:	Día 1		Día 4		Día 7		Día 10		Día 13		Día 16		Día 19		Día 22		Día 25		Día 28	
				M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
1	T1	A1B1R1	0	15	0	15	0	15	1	14	1	13	1	12	1	11	0	11	1	10	2	8	
2	T2	A1B2R1	0	15	1	14	0	14	0	14	1	13	0	13	2	11	1	10	0	10	1	9	
3	T3	A2B1R1	0	15	1	14	0	14	4	10	0	10	0	10	1	9	0	9	1	8	1	7	
4	T4	A2B2R1	0	15	0	15	0	15	0	15	2	13	0	13	1	12	1	11	1	10	2	8	
5	T5	A3B1R1	0	15	1	14	1	13	0	13	2	11	1	10	2	8	2	6	2	4	2	3	
6	T6	A3B2R1	0	15	1	14	1	13	2	11	2	9	2	7	2	5	2	3	2	1	1	0	
7	T7	AC0R01	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	
8	T7	AC0R02	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	
9	T6	A3B2R2	0	15	1	14	1	13	2	11	2	9	2	7	2	5	2	3	2	1	1	0	
10	T5	A3B1R2	0	15	0	15	1	14	3	11	5	9	1	8	2	6	0	6	1	5	1	4	
11	T4	A2B2R2	0	15	0	15	0	15	1	14	1	13	1	12	1	11	1	10	2	8	2	6	
12	T3	A2B1R2	0	15	1	14	1	13	0	13	2	10	0	10	0	10	1	9	1	8	2	6	
13	T2	A1B2R2	0	15	1	14	0	14	0	14	1	13	0	13	2	11	1	10	0	10	1	9	
14	T1	A1B1R2	0	15	0	15	0	15	1	14	1	13	2	11	1	10	0	10	1	9	1	8	
15	T6	A3B2R3	0	15	1	14	1	13	1	12	2	10	2	8	2	6	2	4	2	2	2	0	
16	T7	AC0R03	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	
17	T4	A2B2R3	0	15	1	14	1	13	1	12	2	10	1	9	1	8	1	7	1	6	1	5	
18	T5	A3B1R3	0	15	1	14	2	12	2	10	1	11	2	9	1	8	1	7	2	5	2	0	
19	T2	A1B2R3	0	15	1	14	0	14	1	13	0	13	2	11	2	9	0	9	1	8	1	7	
20	T3	A2B1R3	0	15	0	15	1	14	1	13	1	12	1	11	0	11	1	10	2	8	2	6	
21	T1	A1B1R3	0	15	1	14	0	14	2	12	0	12	1	11	0	11	1	10	1	9	2	7	
22	T5	A3B1R4	0	15	1	14	1	13	1	12	2	10	2	8	1	7	1	6	3	3	2	0	
23	T4	A2B2R4	0	15	1	14	0	14	0	14	2	12	2	10	2	8	1	7	2	5	2	3	
24	T7	AC0R04	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	
25	T6	A3B2R4	0	15	1	14	1	13	2	11	2	9	2	7	2	5	2	3	2	1	1	0	

Anexo 11: Identificación de *Beauveria bassiana* en las larvas muertas.



Anexo 12: Insectos infestados de *Beauveria bassiana* en PDA



Anexo 13: Hoja de vida

Hoja de vida del Tutor

INFORMACION PERSONAL

Nombres: Edwin Marcelo Chancusig Espín

Fecha de nacimiento: 10/02/1962

Cédula de ciudadanía: 0501148837

Estado civil: Casado

Número telefónico: 0997391825

Tipo de discapacidad: Ninguna

De carnet CONADIS: Ninguna

E-mail: edwin.chancusig@utc.edu.ec



FORMACIÓN ACADÉMICA

Ingeniero Agrónomo UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Magister en Desarrollo Humano y Sostenible UNIVERSIDAD BOLIVARIANA

Magister en Gestión En Desarrollo Rural Y Agricultura Sustentable

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA-TINGO MARIA- PERÚ

HISTORIAL PROFESIONAL

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

AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:

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

Anexo 14: Protocolo



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

Título:

“PROTOCOLO PARA LA MULTIPLICACIÓN DE *Beauveria bassiana*”

Autora:
Caillagua Tayo Kateryn Lisbeth

LATACUNGA – ECUADOR
Agosto 2022

Materiales

Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Frascos de laboratorio 50,100,500 ml
- Probetas 50,1000 ml
- Pinzas entomológicas
- Estuche de disección
- Láminas porta objetos
- Láminas cubre objetos
- Vasos de precipitación 50,100, 200 ml
- Mechero
- Matraces de Erlenmeyer 50, 100, 200 ml
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas 100, 200 ul
- Gradilla
- Mandil
- Guantes de laboratorio
- Papel
- Azas
- Marcadores para rotular

Insumos y reactivos

- Medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar)
- Gentamax
- Alcohol al 90
- Papel parafilm
- Plástico film
- Agua destilada

Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora

- Microscopio
- Vortex
- Refrigeradora
- Cámara de Neubauer
- Autoclave
- Balanza
- Agitador magnético de laboratorio
- Estereoscopio

Medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) se realiza de la siguiente manera

La cantidad correspondiente de agua destilada es de: 100ml para 5 cajas Petri

1. En un frasco de vidrio tomamos 400 ml de agua destilada.
2. En la balanza digital se pesa 15,6 gramos de PDA, la cual pasamos al frasco de vidrio y mezclamos los 400ml de agua destilada con los 15,6 gramos de PDA.
3. Agitamos el frasco de vidrio hasta obtener una muestra homogénea.
4. Se debe llevar el frasco de vidrio hasta la autoclave para esterilizar la mezcla a 35°C por 35 minutos.
5. Al terminar la esterilización sacamos el frasco de vidrio, se deja que la temperatura llegue a 21 °C y se aplica antibiótico Gentamax.
6. Se utiliza 50µl de Gentamax por cada 100ml la mezcla, tomar en cuenta que la mezcla del medio de cultivo no tiene que estar muy caliente ya que esto provoca que el antibiótico bajara su efectividad.
7. Se utiliza la ampolla de gentamax es para evitar la contaminación de bacterias en el medio de cultivo este proceso es realizado en la cámara laminar.
8. Vertemos la solución a las respectivas cajas Petri y se deja solidificar.

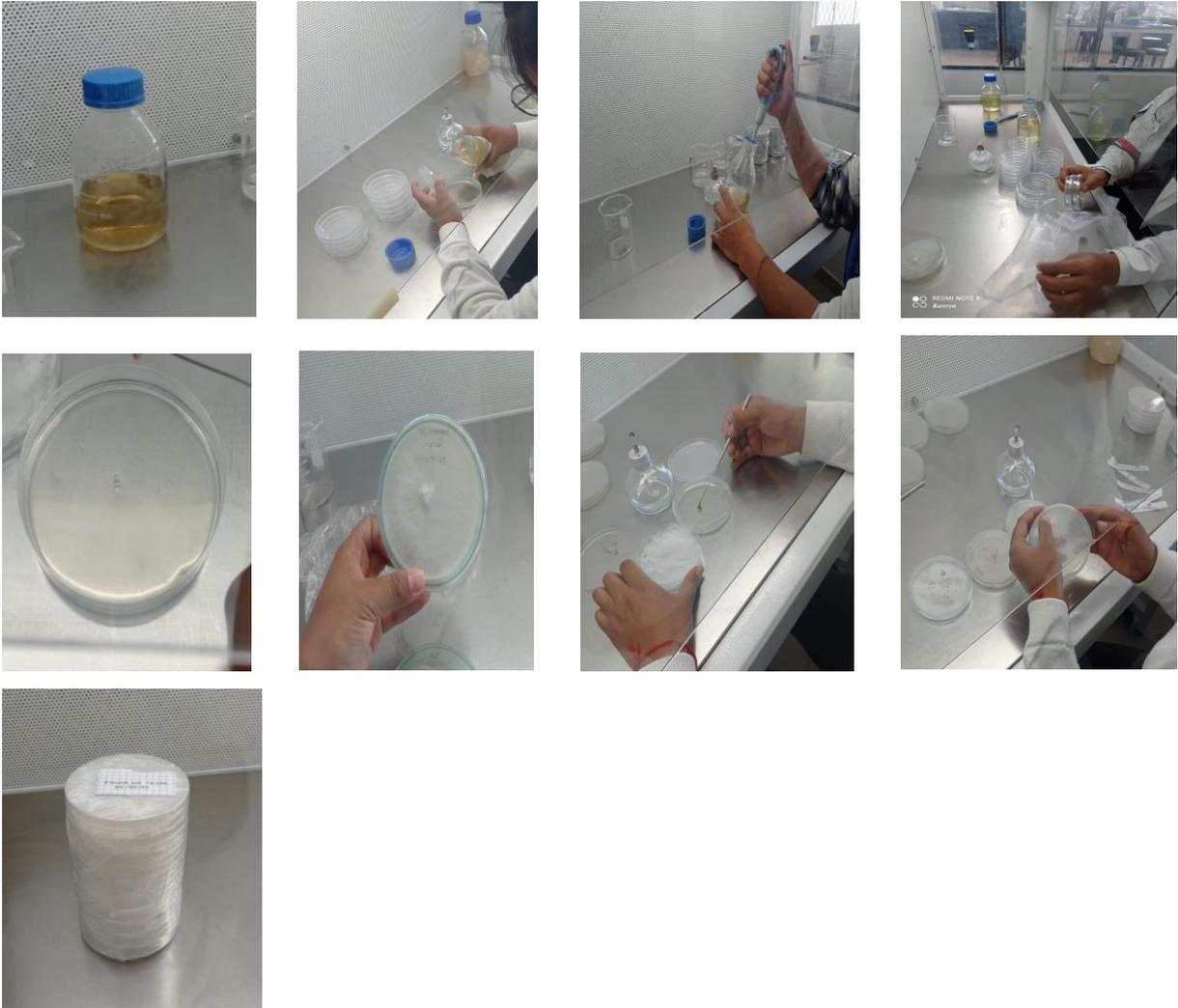
Método de multiplicación

Esta fase se realiza con un cultivo monoespórico para multiplicar *Beauveria bassiana*.

Se realizó los siguientes pasos:

- 1) Se prepara medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar), se procede a llevar a la autoclave al terminar se deja el medio de cultivo en la cámara laminar.
- 2) Cuando el medio de cultivo está en una temperatura de 21° se procede a poner el antibiótico gentamax.
- 3) En papel aluminio envolvemos azas, pinzas, porta bisturí, puntas de micro pipeta y esterilizamos 35 minutos, al terminar se deja en la cámara laminar.
- 4) Se procede a limpiar la cámara laminar con hipoclorito de sodio y alcohol.
- 5) En un vaso de precipitación se debe poner agua destilada, en otro vaso de precipitación dispensamos alcohol, esto se lleva a la cámara laminar incluyendo el mechero, esto nos sirve para flamear el bisturí y evitar contaminación.
- 6) En las cajas Petri vertemos el medio de cultivo y dejamos solidificar.
- 7) Seleccionamos la mejor muestra de *Beauveria bassiana*, está se lleva a la cámara laminar, hacemos cortes con el bisturí en cuadrados, debemos seleccionar donde mejor está el micelio, con una pinza se debe pasar a las cajas Petri con el medio de cultivo ya solidificado.
- 8) Se procede a sellar las cajas con papel parafilm, con un bolígrafo se debe marcar la caja Petri esta debe tener los siguientes datos: fecha y nombre del hongo, sellamos con plástico film y se lo lleva a la incubadora a unos 25°.
- 9) Durante los 7 días se observa las cajas Petri cubiertas de *Beauveria bassiana*.

Gráficos protocolo 1



🚦 Método para el conteo de UFC (Unidad formadora de colonias)

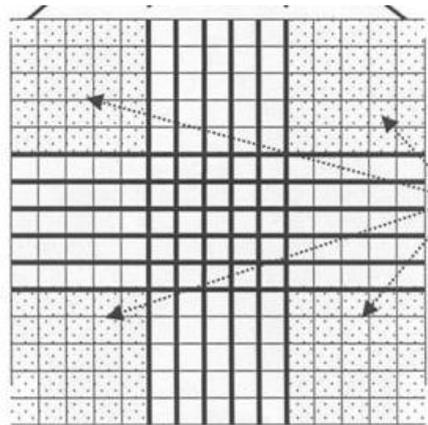
Las colonias son apreciables para su recuento:

- a) Debemos elegir la caja Petri con *Beauveria bassiana* con la cual vamos a realizar el conteo.
- b) En la caja Petri donde está el hongo de *Beauveria bassiana* colocamos agua destilada.
- c) Con una aza se debe raspar el hongo.
- d) En un vaso de precipitación se debe colocar la solución del hongo que raspamos.
- e) Colocamos 4 tubos de ensayo cada tubo con 9 ml de agua destilada esterilizada.
- f) Tomamos 1 ml de la solución madre, procedemos a poner en el primer tubo de ensayo con el vortex agitamos unos 4 minutos, del primer tubo de ensayo se toma 1ml; lo ponemos al segundo tubo de ensayo procedemos a agitar, realizamos el mismo procedimiento hasta llegar al último tubo de ensayo.

- g) Con la micro pipeta obtenemos 1 ml del último tubo de ensayo mezclado con el agitador vortex.
- h) Se debe colocar la muestra en la cámara de Neubauer y la cubrimos.
- i) La muestra se coloca en el microscopio y observamos.
- j) Ya enfocada la muestra procedemos a observar los cuadrantes los cuales deben contener conidios los cuales se debe contar.

❖ **Concentración de conidios (Cuantificación en la cámara de Neubauer)**

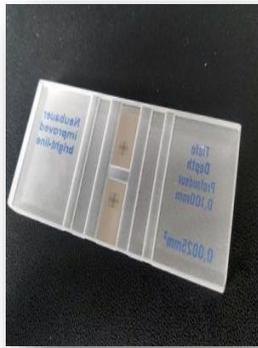
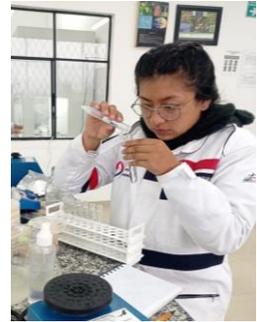
- ✚ Con una micro pipeta de 100 µl se extrae la solución de la muestra madre.
- ✚ Se pasa la muestra a la cámara de Neubauer, se coloca el cubre objetos y por efecto de la capilaridad se llena los cuadrantes de la cámara.
- ✚ Se debe llevar la muestra al microscopio y se observa con el lente que mejor se pueda visualizar los conidios.
- ✚ Contar los cuadrantes de las esquinas donde como se muestra en la imagen señaladas con las flechas.



Para identificar unidades formadoras de colonias se utiliza la siguiente formula:

$$\text{✚ } \text{Conteo de esporas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células} \times 10000}{\text{N}^\circ \text{ de cuadros} \times \text{disolución}}$$

Gráficos protocolo



Anexo 15: Abstract