



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**DE LOS RECURSOS NATURALES**

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA DEL HONGO  
*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. SOBRE EL GUSANO BLANCO DE LA PAPA  
(*Premnotrypes vorax* H.)”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título  
de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

AUTORA: DOMENICA POLETH BERMEO UREÑA  
TUTOR: ING. JUAN GERARDO LOYOLA ILLESCAS, PHD.

Cuenca - Ecuador

2022

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Domenica Poleth Bermeo Ureña con documento de identificación N° 0150544286 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 25 de julio del 2022

Atentamente,



---

Domenica Poleth Bermeo Ureña

0150544286

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Domenica Poleth Bermeo Ureña con documento de identificación No. 0150544286, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo Experimental: “Determinación de la actividad entomopatógena del hongo *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes Vorax* H.)”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 25 de julio del 2022

Atentamente,



---

Domenica Poleth Bermeo Ureña


0150544286

**CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Juan Gerardo Loyola Illescas con documento de identificación N° 0102378544, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA DEL HONGO *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. SOBRE EL GUSANO BLANCO DE LA PAPA (*Premnotrypes vorax* H.)”, realizado por Domenica Poleth Bermeo Ureña con documento de identificación N° 0150544286, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental, que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 25 de julio del 2022.

Atentamente,



---

Ing. Juan Gerardo Loyola Illescas, PhD.

0102378544

**DEDICATORIA**

*A todos quienes han sufrido los efectos del uso de agroquímicos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mis padres por apoyarme económicamente para poder estudiar la carrera que siempre quise; a mi mejor amiga, Gabriela Barros, por estar siempre presente durante este proceso, entendiendo o no de lo que se trataba. Finalmente, a mis docentes, especialmente mi tutor, Ing. Juan Loyola; quien me ha mostrado el camino de la agroecología con pasión y entusiasmo, expresando la esperanza de que los pequeños cambios podrían impactar en el modelo agroproductivo y razón por la que he desarrollado este trabajo de titulación.

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

**°C:** grados Celsius

**ANOVA:** análisis de varianza

**CL<sub>90</sub>:** concentración letal noventa y cinco

**conidias mL<sup>-1</sup>:** conidias por mililitro

**DL<sub>50</sub>:** dosis letal media

**g/L:** gramos por litro

**HR:** humedad relativa

**INIAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

**LSD:** diferencia mínima significativa

**mL:** mililitros

**m.s.n.m.:** metros sobre el nivel del mar

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PDA:** agar papa dextrosa

**TDCR:** tasa diaria de crecimiento radial

**TL<sub>50</sub>:** tiempo letal medio

**uL:** microlitro

**µm:** micrómetro

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<i>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN</i> .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Pregunta de Investigación .....	4
1.4. Objetivos .....	4
1.4.1. General .....	4
1.4.2. Específicos .....	4
1.5. Hipótesis.....	4
1.6. Problema de Investigación .....	5
1.7. Limitaciones .....	7
<i>CAPÍTULO II MARCO REFERENCIAL</i> .....	8
2.1. <i>Premnotrypes vorax</i> .....	8
2.1.1. Origen y distribución geográfica.....	8
2.1.2. Taxonomía.....	9
2.1.3. Ciclo de vida y hábitos .....	9
2.1.4. Emergencia.....	13
2.2. Control biológico mediante hongos entomopatógenos .....	16



2.3. <i>Beauveria bassiana</i> .....	16
2.3.1. Origen y distribución geográfica.....	16
2.3.2. Taxonomía.....	17
2.3.3. Hospederos .....	18
2.3.4. Morfologojogía.....	18
2.3.5. Condiciones de crecimiento .....	19
2.3.6. Mecanismo patogénico de <i>B. bassiana</i> en <i>P. vorax</i> .....	20
2.4. Métodos utilizados en la fase experimental .....	26
2.4.1. Obtención de cultivo monospórico .....	26
2.4.2. Caracterización biológica.....	26
2.4.3. Determinación de la tasa de mortalidad de insectos .....	26
2.4.4. Análisis estadístico de Probit .....	27
<i>CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	28
3.1. Características del lugar de estudio .....	28
3.2. Metodología .....	28
3.2.1. Fase de campo .....	28
3.2.2. Fase de laboratorio .....	30
3.2.3. Evaluación estadística .....	34
<i>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	36
4.1. Caracterización biológica de <i>Premnotrypes vorax</i> .....	36

4.2. Aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> .....	36
4.2.1. Caracterización macroscópica.....	36
4.2.2. Caracterización microscópica .....	37
4.2.3. Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR .....	38
4.2.4. Evaluación del porcentaje de germinación.....	40
4.3. Patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Premnotrypes vorax</i> .....	40
<i>CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i> .....	47
5.1. Conclusiones .....	47
5.2. Recomendaciones.....	48
<i>REFERENCIAS</i> .....	50
<i>ANEXOS</i> .....	63
Anexo 1. Recolección del material biológico .....	63
Anexo 2. Siembra de <i>B. bassiana</i> a partir de <i>P. vorax</i> .....	63
Anexo 3. Cultivo monospórico de <i>B. bassiana</i> .....	64
Anexo 4. Bioensayos de patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre <i>P. vorax</i> .....	64
Anexo 5. Distintas etapas de desarrollo de <i>P. vorax</i> .....	65
Anexo 6. Caracterización macroscópica y microscópica de <i>B. bassiana</i> .....	66
Anexo 7. Resultados de bioensayos: <i>B. bassiana</i> sobre <i>P. vorax</i> .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Larvas de <i>P. vorax</i> .....	10
Figura 2. Galería pupal de <i>P. vorax</i> .....	11
Figura 3. Pupa de <i>P. vorax</i> en estadio final .....	12
Figura 4.(A) Estructura de <i>B. bassiana</i> microscópica (400x) (1)conidia, (2) conidioforo, (3) hifa. (B) Esctructuras de <i>B. bassiana</i> obtenido por la autora.....	19
Figura 5. Lugar de muestreo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Premnotrypes vorax</i> .....	29
Figura 6. <i>Premnotrypes vorax</i> en el campo y en tubérculo .....	63
Figura 7. Siembra primaria de <i>B. bassiana</i> tomado de <i>P. vorax</i> .....	63
Figura 8. Siembra de una colonia de <i>B. bassiana</i> para obtener un cultivo monospórico .....	64
Figura 9. Preparación de bioensayos: Desinfección de <i>P. vorax</i> y retiro de exceso de humedad	64
Figura 10. Unidad experimental.....	65
Figura 11. Etapas de desarrollo de <i>P. vorax</i> .....	66
Figura 12. Estructuras de <i>B. bassiana</i> bajo el microscopio (40x) .....	66
Figura 13. Ataque de <i>B. bassiana</i> sobre <i>P. vorax</i> en su etapa de gusano y adulto .....	67

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Taxonomía de <i>Premnotrypes vorax</i> .....	9
Tabla 2. Cuadro bioecológico del gusano blanco de la papa .....	15
Tabla 3. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
Tabla 4. Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
Tabla 5. Tratamiento, número de repetición, concentración del suspensión de esporas y número de gusanos utilizados.....	34
Tabla 6. Características macroscópicas observadas en los aislamientos .....	37
Tabla 7. Características microscópicas observadas en los aislamientos .....	38
Tabla 8. Longitud de radio y velocidad de crecimiento radial (concentración $1 \times 10^7$ conidias $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo .....	39
Tabla 9. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 4to día post inoculación .....	42
Tabla 10. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 6to día post inoculación .....	43

**ÍNDICE DE GRÁFICAS**

Gráfico 1. Crecimiento radial (concentración $1 \times 10^7$ conidias $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo. ....	39
Gráfico 2. TDCR (concentración $1 \times 10^7$ conidias $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo. ....	40
Gráfico 3. Mortalidad acumulada de adultos de <i>P. vorax</i> con relación a la concentración empleada y los días de ensayo.....	41
Gráfico 4. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de <i>P. vorax</i> según las variables dosis - respuesta. ....	45
Gráfico 5. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de <i>P. vorax</i> según las variables tiempo - respuesta.....	46

## RESUMEN

*Premnotrypes vorax* es considerada como una de las plagas que genera más pérdida en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), los daños ocasionados dan como resultado la pérdida del 20% al 50% de todo el cultivo. Como respuesta para el control de esta plaga y bajo el esquema de la Revolución Verde, la agricultura ha empleado de manera desmedida los plaguicidas, afectando el suelo y, por consiguiente, a la seguridad alimentaria y calidad de los productos; además de ser en gran parte responsable de la producción de gases de efecto invernadero, además de los casos de intoxicación que se presentan en los agricultores por mal uso y uso desmedido de los plaguicidas.

Ante esto, se plantea como alternativa el uso de controladores biológicos que incluso puedan llegar a sustituir el uso de agroquímicos, tal es el caso del hongo *Beauveria bassiana*, cuya actividad entomopatógena ha sido evaluada en el presente estudio.

Los ejemplares de *B. bassiana* así como de *P. vorax* fueron aislados de la provincia de Cañar, de un cultivo afectado por la plaga; a nivel de laboratorio fueron caracterizados taxonómicamente y criados bajo condiciones de laboratorio. En el caso de *B. bassiana* se obtuvo un cultivo monospórico con una TCR de  $3,06 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$  y un porcentaje de germinación de 95%. Al poner en contacto directo distintas concentraciones de esporas de *B. bassiana* con *P. vorax* durante 6 días, dio como resultado un valor  $DL_{50}$  de  $2,67 \times 10^4$  conidias/mL,  $CL_{95}$  de  $1,49 \times 10^6$  y un  $TL_{50}$  de 4,02 días. Para el cuarto día de experimentación se obtuvo porcentajes de mortalidad de 40-100%. Los valores obtenidos indican que la cepa aislada de *B. bassiana* tiene potencial como controlador biológico efectivo para *P. vorax*.

**Palabras Clave:** entomopatógeno, gorgojo de los Andes, mortalidad, actividad biopesticida.

## ABSTRACT

*Premnotrypes vorax* is considered as one of the most harmful plagues for potato cultures, it generates damage in plants between 20% to 50% of all culture. As a manner to control this plague from the hand of Green Revolution, agriculture started to use pesticides excessively, affecting the soil and, consequently, food safety and product quality; In addition to being largely responsible for the production of greenhouse gases, in addition to the cases of poisoning that occur in farmers due to misuse and excessive use of pesticides.

Given this, the use of biological controllers is proposed as an alternative that can even replace the use of agrochemicals, such is the case of the fungus *Beauveria bassiana*, whose entomopathogenic activity has been evaluated in this study.

Specimens of *B. bassiana* as well as *P. vorax* were isolated from the province of Cañar, from a crop affected by the plague; at the laboratory level they were taxonomically characterized and reared under laboratory conditions. In the case of *B. bassiana*, a monosporic culture was obtained with a TCR of 3.06 mm\*day<sup>-1</sup> and a germination percentage of 95%. Putting different concentrations of *B. bassiana* spores in direct contact with *P. vorax* for 6 days resulted in an LD<sub>50</sub> value of 2.67x10<sup>4</sup> conidia/mL, LC<sub>95</sub> of 1.49x10<sup>6</sup> and a LT<sub>50</sub> of 4.02 days. For the fourth day of experimentation, mortality rates of 40-100% were obtained. The values obtained indicate that the isolated strain of *B. bassiana* has potential as an effective biological controller for *P. vorax*.

**Keywords:** entomopathogenic, Andean weevil, mortality, biopesticide activity.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*) es originario de América Latina y es considerado como el tercer cultivo más importante a nivel mundial, después del trigo y el arroz.

Según cifras del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), la papa se produce en 10 provincias y 80 cantones de la Sierra y el consumo per cápita para 2018 fue de 25,32kg (El Universo, 2020). En el periodo 2019 la superficie total sembrada fue de 20.626 hectáreas, con una producción de 275.346 toneladas (INEC- ESPAC, 2020); la media de producción anual de papa consiste en 421 000 toneladas la misma se ha visto afectada por diversas plagas, según reporta Basantes, Aragón, Albuja & Illescas (2020) se ha generado una baja de rendimiento en la producción pasando de ser 16,28 toneladas por hectárea (t/ha) en 2018, a 13 t/ha para 2019.

El gusano blanco de la papa pertenece al género *Premnotrypes*, se caracterizan por atacar a cultivos de papa nativos de los Andes ubicados entre los 2800 y 4700 msnm. Según establece Pierce (1914), este se distribuyen por toda la cordillera de los Andes, con mayor número de especies concentradas en Perú y Bolivia, los cuales son considerados como centros de origen de esta plaga al momento de exportar sus producciones de papa.

Esta plaga genera un nivel de pérdida de valor comercial del 20% al 50% (Torres et al., 2011), por lo que es considerado como una de las plagas más importantes del cultivo de papa en



la parte alta de la sierra ecuatoriana, cuando el ataque es severo y no se controla adecuadamente, puede ocasionar la pérdida total del cultivo.

Entre las técnicas para el Manejo Integrado de esta plaga, se encuentra la aplicación de enemigos naturales o controladores biológicos pudiendo ser *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (R. P. Naranjo, 2008), este hongo es considerado uno de los agentes de control biológico con mejor eficiencia en el sector agrícola, puesto que controla diversos tipos de plagas, tal como se ha podido evidenciar en el control de larvas de polilla (Bustamante R., 2019), arácnidos como *Olugonycus sp* (Huanes-carranza, 2017), entre otros.

En países como España existen empresas como “Control Bio” dedicada a comercializar formulaciones basadas en *B. bassiana* en polvo. También existen casos como en Colombia, donde se utiliza el hongo mencionado para el control de la broca del café, presentando valores de control de la plaga del 10% (Chingal, 2017).

Un estudio similar fue realizado por Fernández J. (2020), en el cual se evaluó la actividad bioplaguicida de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) a nivel de laboratorio, obteniendo resultados positivos en cuanto a reproducción in vitro y niveles de mortalidad del 60, 33% y 96,66%.

## **1.2. Justificación**

Para satisfacer la creciente demanda de alimentos de los más de 9 000 millones de personas que poblarán el planeta en 2050, teniendo también en cuenta sus probables cambios dietéticos, será necesario aumentar la producción de alimentos a escala mundial en un 60% en el mismo período (FAO, 2009).

Dentro del marco de los Objetivos de Desarrollo Sustentable (ODS), establecidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), también se buscan nuevas alternativas a las formas de producción y el control de plagas; de modo que se pueda ajustar la producción de manera sostenible y sustentable.

Entre las principales propuestas se encuentra la del control biológico; este se basa en emplear organismos depredadores, parasitoides u otros para eliminar plagas. Se caracteriza principalmente por no causar daños acumulativos, favorecer la conservación del ambiente, no genera intoxicaciones o efectos dañinos en el humano, tampoco suele generar resistencia en las plagas y la relación costo/beneficio es favorable, existen casos como el del control de la escama roja mediante enemigos naturales que representó un ahorro del 50% comparado con productos sintéticos (UAGro, 2014).

Para la generación de un agente de control biológico es importante combinar estrategias in vitro como in vivo, requiere también de investigación en diferentes niveles desde la microbiología hasta el desarrollo de procesos de ingeniería para poder determinar si la formulación y la forma de aplicación son las más convenientes, así mismo definir la dosis adecuada para el manejo de la enfermedad, todo esto permitirá establecer su uso dentro del proceso productivo del cultivo de modo que respondan a las necesidades de la población y del planeta.

Mediante este trabajo se generarán los valores de dosis letal y concentración mínima de *B. bassiana* para el control de *P. vorax*, siendo de gran utilidad para la posterior formulación de bioplaguicidas que sustituyan el uso de plaguicidas sintéticos.

### 1.3. Pregunta de Investigación

¿Es posible controlar el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* H.) mediante la presencia del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill?

### 1.4. Objetivos

#### 1.4.1. General

Evaluar la actividad entomopatógena del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* H. mediante pruebas de laboratorio para el mejoramiento de la producción y calidad del tubérculo.

#### 1.4.2. Específicos

Caracterizar la cepa de *B. bassiana* mediante pruebas de laboratorio para la determinación de la velocidad de crecimiento y su calidad frente a estudios de diferentes autores.

Establecer la dosis letal del hongo *B. bassiana* sobre *P. vorax* mediante pruebas in vitro para el mejoramiento de la economía del agricultor y la calidad alimenticia de la papa.

Evaluar los resultados de la actividad entomopatógena del hongo *B. bassiana* mediante pruebas estadísticas, para la determinación de la  $DL_{50}$ ,  $TL_{50}$  y  $CL_{90}$  sobre *P. vorax*

### 1.5. Hipótesis

#### Hipotesis alternativa

El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. tiene capacidad entomopatógena sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* H.).

### **Hipótesis nula**

El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no tiene capacidad entomopatógena sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax* H.).

### **1.6. Problema de Investigación**

Bajo el esquema de la Revolución Verde la agricultura ha empleado de manera desmedida los plaguicidas, afectando el suelo y, por consiguiente, a la seguridad alimentaria y calidad de los productos.

En Ecuador, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, INEC, el uso de plaguicidas químicos se da en un 53,57% en cultivos permanentes y en un 77,75% en cultivos de ciclo corto como la papa (INEC, 2016).

Desde la aparición de los pesticidas químicos, estos han sido empleados ampliamente y solo hasta hace pocos años, se ha podido valorar su impacto negativo en el ambiente; se les atribuye del 11 al 15% del total de las emisiones de gases de efecto invernadero (A. Naranjo, 2017).

Los plaguicidas depositan residuos sólidos compuestos principalmente de nitrógeno, generando un aumento en la emisión de óxido nítrico y óxido nitroso. El óxido nitroso es producido por microorganismos en el suelo durante un proceso conocido como desnitrificación a partir de los nitratos presentes de manera natural en el suelo (Asociación Geoinnova, 2016); este proceso incrementa sus tasas de emisión de gases por la alta disponibilidad de nitratos presentes en el suelo debido al empleo excesivo de plaguicidas.

Según The European Chemicals Agency (2021), actualmente se le atribuye el 5% del efecto invernadero, este posee propiedades radiactivas y pueden permanecer hasta 100 años en la

atmósfera; ataca a la capa de ozono reduciéndolo a oxígeno molecular y liberando dos moléculas de monóxido de nitrógeno.

En Ecuador, durante el año 2018, se notificaron un total de 2.113 casos de intoxicación, de los cuales 425 correspondían a intoxicaciones por plaguicidas (Ministerio de Salud Pública, 2019). Incluso se ha encontrado relación con la aparición de enfermedades como leucemia, linfoma no Hodgkin y otros cánceres (Suntaxi, 2019); se conoce también que tiene una fuerte afección sobre la salud sexual y productiva de las mujeres, pudiendo causar abortos o malformaciones en el feto (A. Naranjo, 2017).

En el cultivo de la papa, una de las principales plagas es el gusano blanco, *P. vorax*, este se encuentra en todas las zonas productivas y causa un daño que puede superar el 60% de los tubérculos (INIAP, 2019). Para el control de poblaciones de *P. vorax*, Chirinos et al. (2019) reporta que a pesar de las restricciones legales, se utiliza comúnmente carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato), este se absorbe mediante vía cutánea, pasan a la sangre y se distribuyen a los tejidos donde sufren reacciones de degradación como la N-demetilación, hidroxilación o sulfoxidación; finalmente son eliminadas mediante la respiración, leche u orina; sin embargo, en casos donde la hidroxilación alifática falla, da lugar a inhibidores de colinesterasas, compuestos más dañinos que el producto primitivo (Ferrer, 2003).

En conjunto, todas las consecuencias que trae consigo el uso indiscriminado de plaguicidas, plantean la necesidad de emplear otros métodos de control de plagas.

### 1.7. Limitaciones

El uso de laboratorios se ve limitado y restringido en cuanto al número de usuarios y tiempo de uso, esto con la finalidad de preservar la integridad de las personas. Sin embargo, representa una limitación.

Finalmente, las condiciones climáticas son un factor que limita la presencia y el acceso para la recolección, tanto del hongo (*B. bassiana*) como del gusano (*P. vorax*). En el caso de *P. vorax*, este se encuentra en los cultivos de papa desde que emergen hasta su cosecha, alimentándose de los tubérculos en su etapa larval que dura alrededor de 38 días, se encuentra en temperaturas de aproximadamente 19°C y en zonas a 2800 y 4700 msnm. En el caso de *B. bassiana* se desarrolla a temperaturas de 20°C hasta 27°C y humedad relativa desde 60 hasta 92%, se puede encontrar sobre el gusano blanco muerto, en forma de esporas blanquesinas o amarillas. (Acevedo, 2015) (Doolotkeldieva et al., 2019)

## CAPÍTULO II

### MARCO REFERENCIAL

#### **2.1. *Premnotrypes vorax***

##### **2.1.1. *Origen y distribución geográfica***

*Premnotrypes vorax* es un insecto plaga que ataca a cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), por lo que durante su etapa larvaria toma el nombre popular de gusano blanco de la papa o gorgojo de Los Andes. Pierce (1914) reporta su primera aparición en el año 1913, donde se encontraron exportaciones de papa provenientes de Perú con gorgojos, es por esto que se considera a este como el país de origen de estos insectos; actualmente se distribuyen desde Colombia hasta Bolivia y el extremo de Chile, encontrándose por lo general a los 3000 msnm.

Hustache visualiza por primera vez a *Premnotrypes vorax* en el año de 1955 en la zona de Colombia y Ecuador, confirmando la existencia de varias especies de este insecto en el área del norte de Perú (Kuschel, 1956).

Esta plaga genera un nivel de pérdida de valor comercial del 20% al 50% (Torres et al., 2011), por lo que es considerado como una de las plagas más importantes del cultivo de papa en la parte alta de la sierra ecuatoriana, cuando el ataque es severo y no se controla adecuadamente, puede ocasionar la pérdida total del cultivo.

### 2.1.2. Taxonomía

Tabla 1. Taxonomía de *Premnotrypes vorax*

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden</b>	Coleoptera
<b>Familia</b>	Curculionidae
<b>Género</b>	<i>Premnotrypes</i>
<b>Especie</b>	<i>Premnotrypes vorax</i>

Fuente: (CABI, 2001)

### 2.1.3. Ciclo de vida y hábitos

*P. vorax* se reproduce en su etapa adulta; las hembras depositan aproximadamente 260 huevos en su ciclo de vida que generalmente consiste en 280 días. Cumple con una metamorfosis holometábola; a continuación, se describen sus etapas correspondientes. (Montesdeoca et al., 2013)

#### **Huevos**

Son colocados por la hembra, tienen forma de cilindros ligeramente ovalados, con una coloración entre blanco y crema, se encuentran cubiertos de una sustancia mucilaginosa al momento de ser ovopositados. Miden 1,2 cm de largo y 0,54 cm de ancho; la hembra busca lugares húmedos y cubiertos tales como tallos secos de gramíneas, tallos secos o restos de las cosechas de papas (SAG Chile, 2005).



### ***Gusano o larva***

Al momento de eclosionar, los gusanos miden 0,30 mm de ancho y  $1,6 \pm 0,32$  mm de largo, son de color blanco cremoso, con la cabeza de color café. Para alimentarse se movilizan inmediatamente hacia el tubérculo; Navarro (1995) ha reportado lapsos de 12 horas entre las que el gusano recién emergido busca las papas para refugiarse y alimentarse del mismo dejando a su paso galerías de diferentes tamaños y profundidades por lo que se considera esta como la etapa más dañina para el cultivo, pues las galerías formadas deterioran la calidad del tubérculo e impiden su comercialización.

Los gusanos cumplen un ciclo de 50 días en promedio y posteriormente abandonan el tubérculo y se ubican entre 15 a 25cm de profundidad en la tierra. Al momento de abandonar el tubérculo, el gusano llega a medir entre 1,20 y 1,30 mm de ancho y de 11 a 12 mm de largo, su cuerpo tiene forma de letra "C".



*Figura 1. Larvas de P. vorax*

Fuente: Autora

### ***Pupa***

Dentro de la tierra empieza su estado de pre-pupa y pupa; por lo que necesitan formar las conocidas como cámaras pupales que consisten en celdas formadas de tierra que rodean al

gusano y lo protegen de factores externos mientras completan su estado y se transforman en adultos. Durante esta etapa que dura entre 20 y 32 días, el gusano sufre un proceso de melanización y al final de esta fase se forman los élitros esclerotizados.

Otros estudios han demostrado que las pupas también pueden formarse en la capa superficial del suelo cuando este se encuentra muy compacto (Kühne, 2007).

En esta etapa son más susceptibles al ataque de parásitos naturales tales como *B. bassiana* (Salazar, 1997). Posterior a esta etapa, se dirige al a superficie de la tierra como insecto adulto.



*Figura 2. Galería pupal de P. vorax*

Fuente: Autora



*Figura 3. Pupa de P. vorax en estadio final*

Fuente: Autora

### ***Adulto***

El adulto recién emergido presenta mandíbulas provisionales o deciduas asentadas sobre un área oval de las mandíbulas permanentes, estas le permiten abandonar la celda que formó en su estado pupal. Los adultos jóvenes permanecen en la cámara pupal para la melanización.

Sus cuerpos son de color café-gris de 7 mm de largo y 4 mm de ancho. No pueden volar, pero se movilizan caminando a través del terreno. Los adultos se esconden durante el día en lugares oscuros y húmedos cerca de la planta, o en restos de la misma. Se mantienen en actividad durante la puesta de sol y la media noche donde se alimentan de las hojas y sucede la copulación y ovoposición. La evidencia de que el adulto de *P. vorax* se encuentra en el cultivo se encuentra en los agujeros de las hojas en forma de media luna o circulares.

Su ciclo vital se lleva a cabo dentro del cultivo de papas generalmente a una temperatura promedio de 19°C (INIAP, 2019). Se ha evidenciado que puede sobrevivir entre 1 y 4,5 meses en ausencia de comida dependiendo de las condiciones climáticas (Calvache Guerrero & Alvarado, 1980).

#### **2.1.4. Emergencia**

Se han identificado varias fuentes de infestación de la plaga: la misma siembra, malezas hospederas como llantén negro (*Plantago lanceolata*), gula, coloradilla o pactilla (*Rumex acetosella*), lengua de vaca o pacta (*Rumex crispus*) entre otros; campos contiguos con suelo recién preparado o cosechado hace poco tiempo; y lugares de almacenamiento de papas. La mayor cantidad de adultos en el campo se presenta inmediatamente después de la preparación del suelo (Gallegos et al., 1998)

Por otro lado, debido a la agilidad que presentan sus patas, el insecto se puede movilizar fácilmente varios kilómetros hasta encontrar un cultivo de papa para reproducirse dentro del mismo; o a su vez, se propaga a cultivos cercanos con gran facilidad.

Debido a la manipulación generada por el agricultor al momento de cosechar, los adultos de *P. vorax* abandonan los tubérculos y las plantas en búsqueda de nuevos cultivos cercanos.

En casos como Ecuador, donde el cultivo de papa se da de forma perenne, se ha evidenciado que la población adulta de *P. vorax* se mantiene presente durante todo el año, desde la labranza del suelo hasta alrededor 40 días después de la emergencia del cultivo y también hasta 3 meses después de la cosecha (Gallegos et al., 1998), completando de dos a tres generaciones al año.

#### **2.1.5. Atracción a un fruto**

La papa durante su etapa de cultivo absorbe potasio en grandes cantidades por lo que es una fuente rica en el mismo al momento de consumirla. Al momento de cosecharla, su composición consiste en un 80% agua y un 20% materia seca; esta en su mayoría corresponde a

almidón (CONPAPA, 2017), que es una fuente de energía de consumo inmediato; por lo tanto, mientras se mantengan papas o los restos de sus plantas en el campo de cultivo, los adultos de *P. vorax* se mantendrán presentes aprovechando todas las fuentes disponibles de alimento.

Por otro lado, Valencia (2016), evidenció en su estudio que los insectos adultos se ven atraídos a un cultivo en específico cuando este presenta mayor riego; pues un suelo más húmedo permite la formación de celdas para la etapa de pupa de *P. vorax*.

Kühne (2007) por su lado, evidenció que la presencia de hojas de papa es un fuerte atractivo para los adultos de *P. vorax*, estudios conjuntos con el CIP han relacionado la producción de (Z)-3-hexanol y (E)-2-hexanal también llamado alcohol de hoja y aldehído de hoja; como sustancias que atraen a otras especies de gorgojo hacia el cultivo. Menciona también, que los estudios realizados han generado evidencias de que solo un bajo porcentaje de *P. vorax* logra completar su ciclo de vida, desde huevo hasta adulto, en cultivos diferentes a la papa. En base a este y otros estudios, han llegado a la conclusión que son insectos oligófagos restringidos, probablemente sobrevivieron a través de los años alimentándose de especies de papas silvestres, las que se encontraban de manera permanente a lo largo de la región de los Andes.

La prevalencia de la plaga en el cultivo se puede atribuir a la capacidad de *P. vorax* adulto para sobrevivir en ausencia de alimento, entre 1 y 4,5 meses; y su habilidad para movilizarse entre cultivos, como lo establece Kühne.

Tabla 2. Cuadro bioecológico del gusano blanco de la papa

Fuente: Autora

		FENOLOGÍA CULTIVO DE PAPAS				
		Siembra	Germinación	Floración	Senectud	Cosecha
ETAPAS DE CRECIMIENTO <i>P. Vorax</i>	Adulto libre	x	x			
	Huevo			x		
	Larva				x	
	Pre-pupa				x	
	Pupa				x	
	Adulto					x

### 2.1.6. Daños generados en el tubérculo

*P. vorax* genera daños en casi todas las etapas de crecimiento de la papa como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, su impacto sobre el cultivo no es el mismo. En el caso de los adultos de *P. vorax*, con su actividad nocturna no generan daños relevantes en la planta puesto que se alimentan de las partes de la planta que pueden tolerar daños mecánicos de ese nivel, por ejemplo, el tallo y las hojas; esto siempre y cuando la planta no se encuentre en sus primeras etapas de crecimiento (EPPO, 2022).

El mayor daño es ocasionado por la etapa de larva de *P. vorax* puesto que se alimenta del tubérculo, generando galerías a través del mismo, degradando su calidad y dejándola inservible para su comercialización. Los agricultores generalmente deciden venderlas a un precio inferior en el mejor de los casos, en otros casos se alimentan a otros animales con los tubérculos más

afectados o se consumen dentro del grupo familiar, sin embargo, todas estas alternativas representan pérdidas económicas para los agricultores.

## **2.2. Control biológico mediante hongos entomopatógenos**

El control biológico se define como el uso o manejo de enemigos naturales y organismos benéficos que reducen la población de insectos considerados como plagas cuando se encuentran en un cultivo (Peña et al., 2006). Frente a otras mecánicas de control de plagas, el control biológico se presenta como un método seguro con el ambiente, el agricultor y el consumidor; además de ser económico y no requerir recursos externos al mismo entorno.

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos capaces de atacar insectos usándolos como hospederos para el desarrollo parcial o completo de su ciclo de vida, permiten reducir los niveles de población de plagas de modo que no generen pérdidas económicas, así también disminuyen población de vectores de enfermedades. Estos microorganismos constituyen un grupo de interés para el control biológico de plagas, puesto que aproximadamente el 80% de muertes en insectos tienen agentes fúngicos como causa de la misma (Esparza et al., 2017), prácticamente todos los insectos son susceptibles a algún tipo de enfermedad causada por hongos, la cual conllevaría a la muerte del insecto.

## **2.3. *Beauveria bassiana***

### **2.3.1. Origen y distribución geográfica**

En 1834 Agostino Bassi demostró que un hongo era capaz de producir enfermedades en insectos. Posteriormente, Balsamo Crivell denominó al hongo *Botrytis bassiana*, finalmente

Vuillemin incluye a este hongo dentro del género *Beauveria* (Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, 1999).

Se reporta su presencia en todo el mundo, como parte de la microbiota natural de los suelos (CABI, 2022) (Ergio et al., 2002), se lo ha clasificado también como un hongo saprófito, patógeno y simbiote, por lo tanto, no necesariamente deben atacar a un insecto para completar su ciclo vital (Ortiz-Urquiza, 2021). *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas (Godoy et al., 2007).

### 2.3.2. Taxonomía

Tabla 3. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

<b>Dominio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomiceto
<b>Clase</b>	Sordarlomyceto
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Cordycipitaceae
<b>Genero</b>	<i>Beauveria</i>
<b>Especie</b>	<i>bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin

**Fuente:** (UniProt, 2022)



### **2.3.3. Hospederos**

*B. bassiana* es una de las especies de hongos de mayor interés por su potencial entomopatígeno (SERMARNAT & INE, 2008); se reportan aproximadamente 700 especies de invertebrados hospederos de este hongo (Doolotkeldieva et al., 2019).

### **2.3.4. Morfologojogía**

#### **2.3.4.1. Características macroscópicas**

Las colonias de *Beauveria bassiana* estan compuestas de esporas que varian de color entre blanco y crema por la parte superior y en el reverso del cultivo se presenta un color amarillento (Humber, 2005); el tamaño de la colonia varía entre 0,6 a 2,3 cm de diámetro con un aspecto polvoriento y apariencia de lanas debido a la abundancia de conidios (García et al., 2011). En el hospedero se presenta forma similar; textura algodonosa blanca sobre el cuerpo del insecto.E

#### **2.3.4.2. Características microscópicas**

Sus conidióforos miden entre 1 y 2  $\mu\text{m}$  de diametro y es donde nacen las células conidiógenas, estas generalmente se encuentran agrupadas, al final de las células conidiógenas se forma el raquis donde se sostienen las conidias. El raquis mide hasta 20 $\mu\text{m}$  de longitud y 1 $\mu\text{m}$  de diámetro. Las conidias son globosas y miden entre 2 y 3  $\mu\text{m}$ , se encuentran insertados en el raquis de forma opuesta unos a otros. (CIP, 2004)

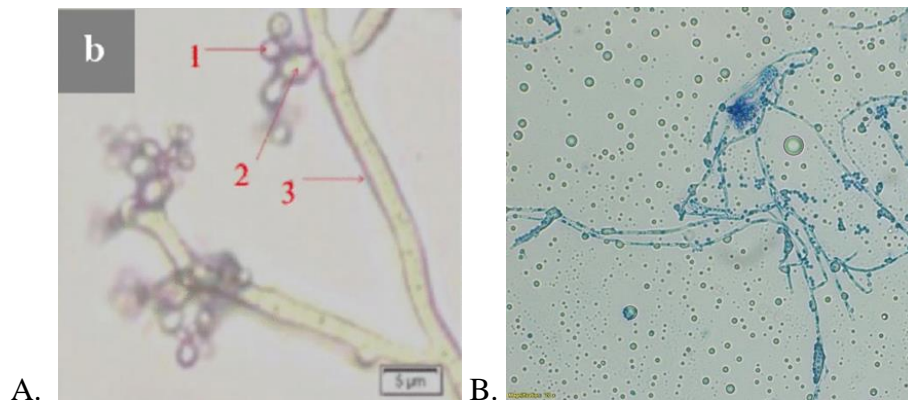


Figura 4.(A) Estructura de *B. bassiana* microscópica (400x) (1)conidia, (2) conidioforo, (3) hifa. (B) Estructuras de *B. bassiana* obtenido por la autora

**Fuente:** (Afandhi et al., 2019) y Autora

### 2.3.5. Condiciones de crecimiento

Tabla 4. Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

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

**Fuente:** (Fernández, 2020)(Lopes et al., 2018)

### **2.3.6. Mecanismo patogénico de *B. bassiana* en *P. vorax***

El desarrollo de la micosis se desarrolla en tres etapas. La etapa inicial inicial y también la más crítica, es la adhesión de la conidia en conjunto con la penetración de la cutícula que se da por acción de hidrolasas (quitinasas y lipasas) encargadas de degradar la cutícula y atravesar la barrera antimicrobiana del hospedero, además de la fuerza mecánica ejercida por las hifas del hongo. En la siguiente etapa las hifas penetran en la hemolinfa, crecen dentro de los órganos internos y salen al exterior del cadáver del hospedero para formar el micelio y los conidios (Holder & Keyhani, 2005).

El proceso infeccioso de *B. bassiana* sigue siendo estudiado mediante análisis genómicos que han permitido identificar genes de virulencia relacionados con su patogenicidad y además se han identificado ciertas toxinas y enzimas que cumplen un papel fundamental en el proceso micótico.

#### **2.3.6.1. Adhesión de la spora a la cutícula y germinación de las esporas**

La adhesión implica mecanismos no específicos que dependen de las propiedades hidrofóbicas de las paredes celulares de las conidias y la interacción con la superficie hidrofóbica del exoesqueleto de los hospederos (Esparza et al., 2017), *B. bassiana* presenta proteínas ricas en cisteína llamadas hidrofobinas en las paredes celulares de las conidias; también sintetizan moléculas denominadas adhesinas que permiten la adhesión al hospedero.

*B. bassiana* también posee un subconjunto de monooxigenasas del Citocromo P450 que permiten utilizar los lípidos de la cutícula del hospedero como fuente de carbono; la movilización de los lípidos se ha relacionado con la formación de estructuras de penetración y

esporas más infecciosas (Ortiz-Urquiza, 2021) (O. Beys et al., 2009), así como la producción de sustancias mucilaginosas que penetran los poros de la cutícula.

La estructura de penetración es denominado órgano apresorio, el mismo que penetra la cutícula del hospedero usando fuerza mecánica y se forma al final del tubo germinal una vez que se ha dado la adhesión.

El crecimiento del hongo se puede dar de forma lateral lo que puede causar fracturas en el exoesqueleto facilitando el ingreso al organismo del insecto, pudiendo evidenciarse en la formación de agujeros circulares alrededor del órgano apresorio de *B. bassiana* (K. Charnley, 2003).

#### **2.3.6.2. Penetración en el hemocele**

La cutícula del insecto está formada por tres capas; la más externa se denomina capa de cuticulina o envoltura con un grosor de 10 a 30 nm; debajo de esta se encuentra la epicutícula con un grosor de 0,5 a 2nm, seguido de la procutícula donde la quitina y las proteínas forman una matriz cientos de veces más gruesa que las capas externas. Finalmente, las células de la epidermis se encuentran por debajo de la procutícula, y por debajo de la epidermis se encuentra el hemocele.

Las enzimas encargadas de degradar la cutícula incluyen proteasas, quitinasas y lipasas (Monzón, 2001); por otro lado, la producción de ácido oxálico en la superficie del insecto como en la hemolinfa facilita la hidrolización de las proteínas de la cutícula. La alcalinización de la cutícula durante la micosis promueve también la actividad de las proteasas.

Las enzimas que intervienen se producen de forma secuencial; las estereasas y enzimas proteolíticas se producen en las primeras 24 horas, seguidas de las N-acetilglucosaminidasa, la enzima quitinasa y lipasas son producidas entre el tercer y quinto día.

*B. bassiana* por su parte produce metabolitos secundarios como beauvericina, bassianina, bassianolida, beauverolitos, tenelin, osporeína, ácido oxálico, cristales de oxalato de calcio y otros análogos a la beauvericina (H. Wang et al., 2021), los mismos que actúan dependiendo de la superficie del hospedero, sin embargo, el concepto que se puede generalizar, es que la penetración del exoesqueleto se da por la acción conjunta de enzimas y metabolitos que permeabilizan la cutícula el insecto.

El conjunto de estrategias de ataque entomopatógeno incluye la proliferación de factores de virulencia que impiden la activación del sistema inmune del hospedero, interumpen las vías de conducción nerviosa, daña la epidermis, obstruye los espiráculos, las absorción de agua y nutrientes.

Dado que la humedad no afecta al proceso de infección, las esporas pueden germinar con facilidad en el tubo digestivo; en otros casos, a pesar de que los fluídos difestivos degraden las hifas, este proceso genera toxinas que también llevan al insecto a la muerte (A. K. Charnley, 1992).

### **2.3.6.3. Replicación del hemocele**

Una vez que ha entrado en contacto con los órganos, el hongo sufre una transformación dismórfica de micelio a levadura; es decir las células pierden su pared celular y desarrollan protoplasto, de este modo evaden el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero

(Vinson, 1991); como mecanismo de evasión se da la producción de toxinas que provocan la melanización y necrosis de tejidos. Después de haber evadido el sistema inmune, empieza el proceso de septicemia.

El insecto puede responder a la infección mediante mecanismos humorales (fenol-oxidasas, lectinas, proteínas y péptidos de defensa), mecanismo celular (fagocitosis, encapsulación) o ambos. Cuando los nutrientes, en especial las fuentes de nitrógeno, se terminan, la fase de levadura termina y retoma el crecimiento micelial. Finalmente, el curso de la infección va a depender de la edad del insecto, su estado nutricional y factores externos como temperatura, humedad, luz ultravioleta, entre otros.

La toxicidad fúngica involucra factores directos e indirectos. Uno de estos factores directos es la melanina, que es un compuesto fenólico y/o de indol con componentes lipídicos o proteicos. La melanina puede contrarrestar los rayos UV, la citotoxicidad de los metales y las lisozimas en la epidermis de los insectos. La melanina también participa en la formación de compuestos antifúngicos, como los péptidos de defensa que contrarrestan la respuesta del huésped, por lo que se clasifica como un factor directo. Además, los hongos regulan la expresión y la traducción de genes de respuesta al estrés oxidativo para contrarrestar la respuesta inmunitaria del huésped.

*B. bassiana* también ejerce otros factores que pueden inhibir directamente el sistema inmunológico del huésped. Estas son principalmente las proteínas activas o los metabolitos secundarios con propiedades insecticidas, como los péptidos no ribosómicos ciclooligómeros (beauvericina), los péptidos cíclicos (beauverolidas) y la 2-piridona tenelina. Estos factores

también pueden funcionar como compuestos inmunosupresores. En particular, un estudio en *Triatoma infestans* mostró que, en comparación con el tercer día de infección, muchos de los genes de defensina y péptido antimicrobiano se inhibieron significativamente en el noveno día de infección (Mannino et al., 2019). Aunque no se confirmó el mecanismo de regulación, en gran parte se debió a las toxinas fúngicas (Baldiviezo et al., 2020). Estos hallazgos sugieren que los hongos que secretan metabolitos secundarios pueden resistir el sistema inmunitario de los huéspedes tanto a nivel genético como no fisiológico, lo que sienta las bases para la patogenicidad de la(s) toxina(s).

La micosis induce anormalidades en el insecto como convulsiones, descoordinación, alteración del comportamiento y parálisis; estas en conjunto dan como resultado la muerte puesto que se genera daño físico en los tejidos, intoxicación, deshidratación de las células debido a la pérdida de fluidos y el consumo de nutrientes (Bustillo, 2001).

Para completar el ciclo infeccioso, los hongos deben combatir el sistema de defensa del insecto sintetizando proteasas que degraden el sistema humoral, así como usando depsipéptidos cíclicos, incluyendo destruxinas que causan parálisis en el insecto impidiendo que abran canales de calcio; así también se producen otras toxinas que generan daños en el sistema muscular y en los túbulos de Marpighi, afectando la excreción y bloqueando su habilidad de alimentarse y moverse (Pal et al., 2007).

Aunque no ha sido posible aun identificar todas las enzimas y su función específica en el proceso entomopatógeno, se ha determinado la presencia de genes que codifican siete proteínas Cry, 13 enterotoxinas termolábiles y 3 toxinas zeta. Frente a esto se plantea la hipótesis de que

las toxinas Cry y las enterotoxinas serían las responsables de alterar la permeabilidad epitelial del intestino de los insectos facilitando así el proceso de infección; por otro lado, las toxinas zeta podrían funcionar como agentes bactericidas, similar a la función que cumple la oosporeína, un pigmento rojo dibenzoquinona, la misma que limita la presencia bacteriana en los hospederos muertos a causa de *B. bassiana*, permitiendo que el hongo pueda aprovechar al máximo los nutrientes del hospedero así como crecer y esporular sobre el cadáver (Fan et al., 2017). Además, se ha demostrado que la oosporeína cumple tres vías mecánicas: (1) inhibe la división de la profenoloxidasa en polifenoloxidasa (PPO), que luego dificulta la activación de la profenoloxidasa (PO); (2) Inhibe directamente la expresión del péptido antifúngico galerimicina (del gen Gal) a nivel postranscripcional; y (3) bloquea la respuesta en cascada del péptido antimicrobiano (Feng et al., 2015).

Una proteína denominada MCL1 también enmascara compuestos de la superficie celular, lo que dificulta la detección de cuerpos de hifas en hemocitos de insectos (J. Wang et al., 2016). Este proceso contrarresta indirectamente el sistema inmunológico de los insectos.

Cuando las condiciones son favorables, las hifas pueden emerger hacia el exterior. Generalmente esto ocurre en zonas como la membrana intersegmental o los espiráculos. Las hifas forman conidióforos, dando lugar a esporas asexuales que son unidades infectivas con función de diseminación. La esporulación normalmente ocurre en cadáveres, pero también puede ocurrir en insectos vivos (CIP, 2004). La dispersión de esporas puede ser un proceso activo o pasivo y depende de las características de la spora y el esporangio.



## **2.4. Métodos utilizados en la fase experimental**

### ***2.4.1. Obtención de cultivo monospórico***

Al obtener un aislado directo del campo su información genética no es homogénea y da como resultado cambios en las propiedades físicas, fisiológicas y bioquímicas; es por esto que se deben obtener cultivos monospóricos, genéticamente homogéneos más estables en cuanto a sus propiedades (Ayala M et al., 2012).

### ***2.4.2. Caracterización biológica***

Se estudiar características macro y microscópicas para determinar la especie a la que pertenece en base a las claves taxonómicas. Por otro lado, se puede analizar la calidad de desarrollo determinando la tasa de crecimiento radial del micelio y porcentaje de germinación del hongo (Antonio et al., 2008).

### ***2.4.3. Determinación de la tasa de mortalidad de insectos***

La Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ) es un valor virtual obtenido estadísticamente. Se trata de un valor calculado que representa la mejor estimación de la dosis requerida para producir la muerte en el 50% de los organismos de estudio (Reyes, 2016).

El Tiempo Letal 50 ( $TL_{50}$ ) comprende el tiempo promedio transcurrido en los diferentes individuos, desde la aplicación del tóxico hasta su muerte. Se refiere al 50% de los individuos experimentados (Calvo & Mendoza, 2012).

La Concentración Letal 90 ( $CL_{90}$ ) referida a la concentración que provoca la muerte del 90% de los animales (Nereida Delgado, 2016).

Se replicará las fórmulas para determinar la mortalidad de los insectos utilizada por Fernández (2020).

$$\%M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} * 100$$

Donde,

$M$  = mortalidad

$m_e$  = mortalidad en el extracto

$m_b$  = mortalidad en el blanco

Reemplazando

$$m_e = \frac{r}{n}; \quad m_b = \frac{r'}{n}$$

Donde,

$r$  = insectos muertos en el extracto

$r'$  = insectos muertos en el blanco

$n$  = número de individuos

#### **2.4.4. Análisis estadístico de Probit**

El análisis Probit es un método que analiza la relación entre un estímulo, en este caso la dosis y la cantidad de respuesta. Este tipo de estudios comprende la aplicación de distintas dosis de un estímulo a un grupo de animales, se registra cada dosis y el porcentaje de muertes para ser analizado mediante este modelo (NCSS Data Analysis, 2022).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Características del lugar de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología I, perteneciente a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca con coordenadas 2°53'12.8"S 78°59'26.3"O a 2532 m.s.n.m.

#### 3.2. Metodología

La parte experimental se realizó en dos fases: fase de campo, donde se recolectaron ejemplares de *Premnotrypes vorax*, extrayéndolos de papas afectadas previamente y también directamente del suelo donde se sembraron las papas. Entre estos, se logró visualizar la presencia de un hongo blanquecino sobre algunos gusanos, también se recolectaron los mismos en envases separados.

##### 3.2.1. Fase de campo

##### 3.2.1.1. Recolección del hongo *Beauveria bassiana* y del gusano *P. vorax*

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y los especímenes del gusano blanco (*P. vorax*) se obtuvieron de un cultivo de papas localizado en la parroquia Luis Cordero, cantón Azogues, provincia del Cañar, con coordenadas 2°44'13,3''S 78°48'29,7''O a 2.824 m.s.n.m. y a una temperatura de 18°C.

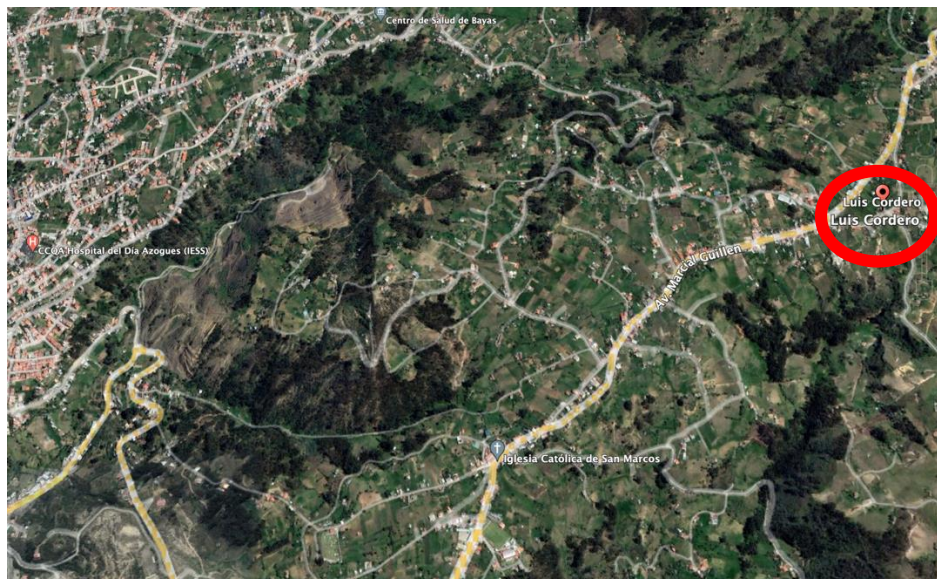


Figura 5. Lugar de muestreo de *Beauveria bassiana* e *Premnotrypes vorax*.

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

Primero se recorrió el terreno de donde se había cosechado las papas afectadas por el gusano blanco y de esta manera se pudo localizar el gusano debajo de la tierra donde se encontraban las papas previamente. Seguido de esto, se recorrió la bodega de almacenamiento del tubérculo, se procedió a recoger las papas que presentaban galerías típicas de *P. vorax*, así como aquellos gusanos que habían dejado la papa y se encontraban en el suelo (ver Anexo 1).

De entre todos los gusanos afectados se separaron aquellos que presentaban en su superficie un crecimiento fungoso de color blanco propio de *Beauveria bassiana*; cabe recalcar que los gusanos en su etapa de pre-pupa fueron aquellos que presentaron esta característica.

Los gusanos se colocaron en fundas ziploc junto con tierra del mismo terreno; por separado se almacenaron las papas que se veían más afectadas.

El material biológico recolectado se colocó en moldes de aluminio con tierra estéril; se repartieron de forma equitativa en tres moldes, tanto las papas que servirán de alimento, como los gusanos. Los moldes se taparon con tela tul para el paso de oxígeno y se aspersó 50ml de agua cada 4 días para mantener la tierra húmeda; la temperatura que se mantuvo fue de entre 18-22°C hasta llevarlo a la etapa de experimentación en laboratorio.

Aquellos gusanos que se encontraban en fase de pre-pupa y presentaban rastros del hongo de interés, fueron trasladados a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana para su caracterización y aislamiento.

### **3.2.2. Fase de laboratorio**

#### **3.2.2.1. Caracterización biológica y cría de *Premnotrypes vorax***

Los ejemplares de *P. vorax* se mantuvieron en moldes de aluminio con tierra estéril a temperatura ambiente, al comprobar que hayan formado celdas en la tierra, fueron trasladados al Laboratorio de Ciencias de la Vida para la confirmación de su especie bajo el estereomicroscopio comparando con claves taxonómicas de Resh V. & Cardé R. (Resh & Carde, 2009).

#### **3.2.2.2. Aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* a partir de gusanos infectados**

Se replicó la metodología empleada por Cañedo V. (2004) con ciertas modificaciones. El proceso consistió en raspar la superficie del insecto que ha manifestado la presencia de *B. bassiana*, con una aguja y sembrar esta muestra en medio nutritivo PDA a 25°C por 4 días (ver Anexo 2).

En un tubo eppendorf se colocó 1ml de solución Tween 80 al 0,1% con una porción del hongo sembrado anteriormente y se agitó en un vortex durante 3 minutos para separar todas las esporas. Se procedió a cargar un hematocímetro con la muestra agitada para contabilizar las esporas y en base a la concentración inicial se preparó una suspensión de esporas de 100 esporas/ml. Se tomó 10uL de la suspensión y se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA esparciendola con ayuda de un asa de Drigalsky; se colocó en la cámara de crecimiento de 25°C por 3 días, donde se pudo observar colonias pequeñas en crecimiento fácilmente extraíbles del medio.

Con ayuda de un bisturí estéril, se procedió a cortar la colonia en crecimiento y sembrarla en una nueva caja Petri (Anexo 2), de este modo se obtuvo un cultivo monospórico del hongo a estudiarse.

### **3.2.2.3. Caracterización biológica de *Beauveria bassiana***

#### **Caracterización macroscópica**

Entre las características que se analizaron fueron: tamaño, pigmentación, forma, borde, elevación, apariencia general y superficie; basándonos en el manual de microbiología de Difco & BBL (1973).

#### **Caracterización microscópica**

Para la caracterización microscópica se realizó una tinción con azul de lactofenol con una muestra del hongo después de 3 días de haberlo sembrado y se observó bajo el microscopio para diferenciar las estructuras características de *B. bassiana* (CIP, 2004).

### **Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR**

Se replicó la metodología empleada por Fernández (2020), donde a partir del cultivo monospórico se prepararon suspensiones de hongos de  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y se sembró 10  $\mu\text{L}$  de esta suspensión en cajas Petri selladas durante 10 días a  $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada día se midió el radio del micelio y se empleó la misma fórmula.

$$V = \frac{x \text{ (mm)}}{t \text{ (d)}}$$

Donde,

$V$  = velocidad de crecimiento radial

$x \text{ (mm)}$  = radio de la colonia en milímetros

$t \text{ (d)}$  = tiempo en días de ensayo

La velocidad de crecimiento se obtuvo promediando las velocidades diarias obtenidas.

### **Evaluación del porcentaje de germinación**

Se replicó la metodología utilizada por Fernández (2020), que consiste en sembrar 5  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  del hongo en cajas Petri durante un día a  $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente se añadió una gota de azul de lactofenol y se contabilizó bajo el microscopio las conidias germinadas y número total de conidias para aplicar la siguiente fórmula y obtener el porcentaje de germinación.

$$\% G = \frac{N^\circ \text{ conidias germinadas}}{N^\circ \text{ total de conidias}} \times 100$$

Donde,

$\% G =$  Porcentaje de germinación

### **3.2.2.5. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei***

Para el ensayo de patogenicidad se utilizó la metodología de Fernández (2020) y (Landázuri et al., 2005) con 3 repeticiones por cada tratamiento.

Los ejemplares de *P. vorax* fueron desinfectados mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril por 3 veces y se colocaron sobre tela estéril para absorber el exceso de humedad. Se utilizó un total de 75 gusanos de *P. vorax* (ver Anexo 4).

A partir del cultivo monospórico se prepararon suspensiones de esporas en 4 concentraciones distintas, sin esporas,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  conidias mL<sup>-1</sup>, cada una marcada como T1, T2, T3, T4 y T5 respectivamente.



*Tabla 5. Tratamiento, número de repetición, concentración del suspensión de esporas y número de gusanos utilizados.*

<b>Tratamiento</b>	<b>Número de repetición</b>	<b>Concentración del inóculo</b>	<b>Número de gusanos</b>
T1	3	Testigo (agua estéril)	5
T2	3	$1 \times 10^4$ conidias mL <sup>-1</sup>	5
T3	3	$1 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup>	5
T4	3	$1 \times 10^6$ conidias mL <sup>-1</sup>	5
T5	3	$1 \times 10^7$ conidias mL <sup>-1</sup>	5

**Fuente:** autora

Los gusanos blancos se inocularon por inmersión durante 1 minuto en 10mL de cada suspensión de esporas preparada, se colocaron sobre tela estéril para eliminar exceso de humedad y se colocaron en grupos de 5 individuos en cajas Petri con tierra estéril; la misma fue humedecida mediante aspersión de agua estéril cada 4 días.

Para el testigo se utilizó la misma metodología, sustituyendo las suspensiones de esporas por agua destilada estéril, este se denominó como T5.

Cada caja Petri rotulada fue almacenada en la cámara de crecimiento a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con HR del 60% y se monitoreó durante 10 días, tomando datos sobre la mortalidad de los gusanos y el crecimiento del hongo en cada vial.

### **3.2.3. Evaluación estadística**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, aplicándose 5 insectos por tratamiento, con 3 repeticiones. Los tratamientos fueron 4 concentraciones de esporas y 1 testigo

sin aplicación del hongo. La mortalidad de los adultos de *P. vorax* se expresó en porcentaje y con los resultados de cada repetición se calculó la mortalidad total. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos en la variabilidad de la variable respuesta, comprobando cuales grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Finalmente se realizó el análisis Probit, para calcular la  $DL_{50}$ ,  $CL_{90}$  y  $TL_{50}$  de la población a través de la ecuación de regresión. Se utilizó el software estadístico MiniTab y Excel.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización biológica de *Premnotrypes vorax*

Bajo el estereomicroscopio, los ejemplares de *P. vorax* en su etapa de larva presentaron color blanco cremoso, con una longitud entre 10 y 14mm en forma de C, característico de la familia *Curculionidae*. Presentaron cabeza diferenciada del cuerpo con mandíbula igualmente visible de color marrón en forma de oz. En su etapa pre-pupa se pudo observar la formación del exoesqueleto con la formación de patas y alas.

En su etapa adulta se puede confirmar las claves taxonómicas que determinaron su especie; su tamaño fue de 7-8mm de largo y 4-5mm de ancho, presentaron color café oscuro en el cuerpo y amarillento en la cabeza que termina en forma de pico. Sus alas están soldadas al cuerpo (ver Anexo 5).

#### 4.2. Aislamiento de *Beauveria bassiana*

##### 4.2.1. Caracterización macroscópica

A los cinco días de almacenamiento en la cámara de crecimiento a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  se pudo observar una colonia de aspecto algodonoso de color blanquecino, el crecimiento se dio de forma radial a partir del centro de la colonia donde se sembró, el crecimiento fue veloz y ocupó el total de la superficie del agar en 7 días; el reverso presentó color amarillento que se fue intensificando con el pasar de los días y envejecimiento de las células. Con el pasar de los días la colonia se veía aún más polvorienta y algodonosa.

Las características macroscópicas analizadas concuerdan con otros autores, como Humber (2005) y CIP (2004), de manera que se puede confirmar la especie.

*Tabla 6. Características macroscópicas observadas en los aislamientos*

Característica	Quinto día		Décimo día	
	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
<b>colonia</b>				
<b>Tamaño</b>	3cm	3cm	6cm	6cm
<b>Pigmentación</b>	Blanco cremoso	Blanco amarillento	Blanco cremoso	Amarillento
<b>Forma</b>	Circular filamentosa	Circular	Circular filamentosa	Circular
<b>Borde</b>	Ramificado	-	Ramificado	-
<b>Elevación</b>	Pulvinada	-	Pulvinada	-
<b>Superficie</b>	Radiada	Lisa	Radiada	Lisa
<b>Grado de crecimiento</b>	Rápido	Rápido	Medio	Medio

**Fuente:** autora

#### **4.2.2. Caracterización microscópica**

Para corroborar la especie del hongo se utilizaron las claves taxonómicas establecidas por Humber (2005), observando una muestra de *B. bassiana* bajo el microscopio después de 7 días de incubación *in vitro*.

Se pudieron observar hifas lisas ramificadas de un ancho aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , en cada ramificación se pudo observar la formación de células conidiógenas. Las conidias tenían forma

redonda con tendencia a ovalarse, medían 1.7 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (ver Anexo 6). En ciertas células se pudieron diferenciar raquis de tipo zig-zag, considerado como una característica clave en *B. bassiana*. Todas estas características coinciden exactamente con las claves taxonómicas que los autores manifiestan.

*Tabla 7. Características microscópicas observadas en los aislamientos*

<i>Beauveria bassiana</i>	Característica microscópica	Aspecto general
<b>Presencia de</b>	Hifas	Hialinas
		Planas
	Conidióforo	Compuesto
		Agrupado
	Células conidiógenas	Alargadas
	Raquis	Forma de zig-zag
	Conidios	Globosos

**Fuente:** autora

#### **4.2.3. Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR**

Al sembrar en medio PDA una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  se procedió a medir el radio de la colonia diariamente y se obtuvo un promedio que dio como resultado los siguientes datos:

Tabla 8. Longitud de radio y velocidad de crecimiento radial (concentración  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo

Día	<i>B. bassiana</i>	
	Radio (mm)	Velocidad de crecimiento radial ( $\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$ )
2	9,5	4,75
3	11	3,66
4	13,5	3,37
5	15	3
6	18	3
7	23	3,28
8	26	3,25
9	29,5	3,27
10	31	3,1

Fuente: autora

Con estos datos se obtuvo una tasa de crecimiento radial TDCR de  $3,06 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$  (ver Gráfica 1), valor muy similar al obtenido por Fernandez (2020), de  $3,61 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$  y una longitud de desarrollo radial de  $36,5 \text{ mm}$  al décimo día bajo las mismas condiciones.

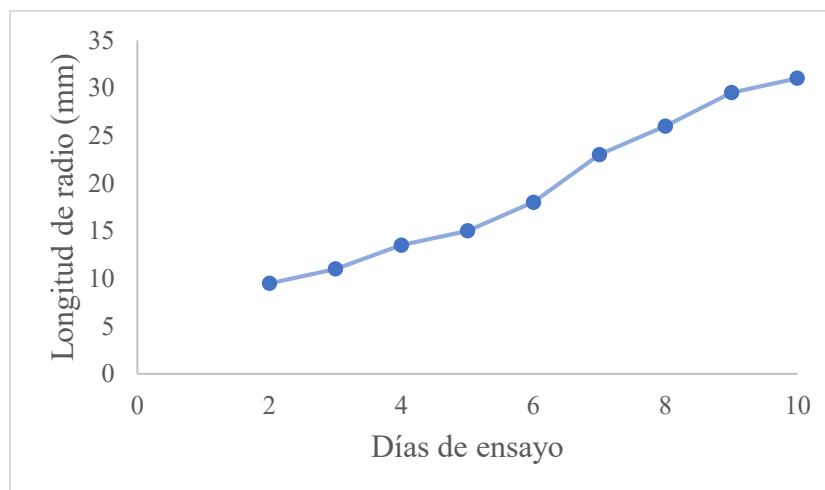


Gráfico 1. Crecimiento radial (concentración  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.

Fuente: autora

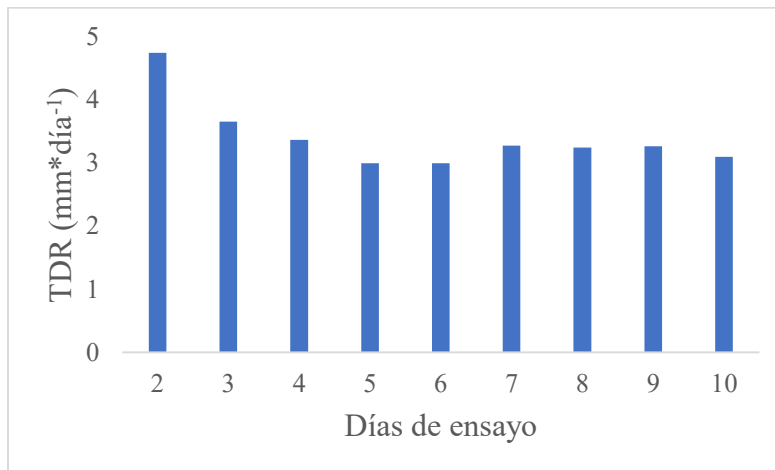


Gráfico 2. TDCR (concentración  $1 \times 10^7$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ ) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.

Fuente: autora

#### 4.2.4. Evaluación del porcentaje de germinación

Mediante la determinación del porcentaje de germinación se logra determinar si la cepa es adecuada para su uso como controlador entomopatógeno, en este caso Gómez, et al. (2017), establecen que es necesario un valor mayor o igual al 90%.

Como resultado del análisis de la cepa utilizada en este trabajo, se obtuvo un valor promedio de 95%, por lo que puede ser utilizado como controlador entomopatógeno.

En cuanto a la cantidad de conidias, se contabilizaron 298 aproximadamente, valor muy aproximado al obtenido por Fernández (2020), quien obtuvo un valor de 328 conidias.

#### 4.3. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Premnotrypes vorax*

La patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. vorax* fue evaluada hasta el 6to día a partir de la aplicación del tratamiento para la obtención de los valores toxicológicos de interés.

Entre las principales manifestaciones de mortalidad se puede mencionar la pérdida de motilidad de los gusanos y la aparición de estructuras fúngicas blancas tanto en la tierra como en la superficie de los gusanos (ver Anexo 7).

En la gráfica 3 se presentan los resultados del bioensayo con respecto a los días que transcurrieron y la mortalidad acumulada que se obtuvo con cada suspensión de hongos.

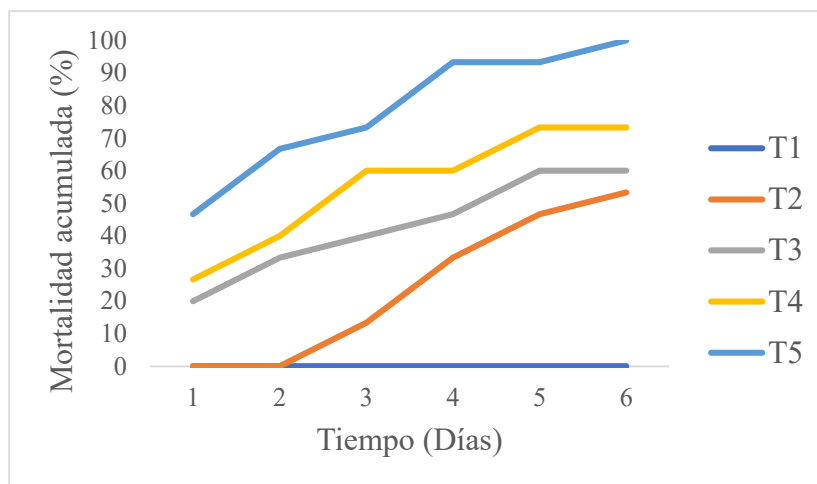


Gráfico 3. Mortalidad acumulada de adultos de *P. vorax* con relación a la concentración empleada y los días de ensayo.

**Fuente:** autora

Cada tratamiento tuvo resultados similares en sus tres repeticiones respectivamente; de todos estos, se puede observar que, al 4to día posterior a la inoculación, el T5 correspondiente a la suspensión de conidias de  $1 \times 10^7$  por mL, fue el tratamiento con mejor porcentaje de mortalidad frente a los demás, dando como resultado un 93,33% de mortalidad, mismo que llegó al 100% dos días después.



A comparación del T5, los T2, T3 y T4 presentaron un porcentaje de mortalidad de 33,33%, 46,67% y 60% respectivamente al cuarto día después de la inoculación; y seis días después presentaron un porcentaje de mortalidad de 40%, 57,14% y 71,43% respectivamente.

En el caso del testigo o T1, no se presentó mortalidad en ninguno de los individuos, lo que nos permite garantizar que la causa de muerte de los otros tratamientos, se debe a la presencia y ataque de *B. bassiana*.

A continuación, se presentan los porcentajes de mortalidad obtenidos, comparando los tratamientos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para discriminación entre medias:

*Tabla 9. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 4to día post inoculación*

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1	3	0	A
T2	3	33,3	B
T3	3	46,67	B
T4	3	60	B
T5	3	93,33	C

**Fuente:** autora

Tabla 10. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 6to día post inoculación

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1	3	0	A
T2	3	53,33	B
T3	3	60	B
T4	3	73,33	C
T5	3	100	D

**Fuente:** autora

Para obtener los datos se utilizó un nivel de confianza del 95% y las tablas se interpretan de la siguiente manera; en la Tabla 8 se analizaron los datos obtenidos el cuarto día después de la inoculación y se determinó cual de los 5 tratamientos fue significativamente diferente de entre ellos. Aquellos tratamientos que no comparten una misma letra son significativamente diferentes, por lo tanto, T2, T3 y T4 no son significativamente distintos uno con otro, sin embargo, el T5, con mayor concentración de esporas/mL es significativamente diferente que los demás, y lógicamente, distinto al testigo, T1, sin tratamiento, donde no se presentó mortalidad.

En el caso de la Tabla 9, se analizaron los datos después del sexto día después de la inoculación, se puede determinar que los tratamientos son significativamente distintos a excepción del T2 y T3, que corresponden a las concentraciones de  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ , las que no son significativamente distintas entre si; nuevamente se reporta que el tratamiento T5 es significativamente diferente a los demás, podemos asumir que se debe a la alta concentración de esporas por mL en el tratamiento.

Los resultados obtenidos en cuanto a mortalidad/dosis muestran una relación positiva, los valores son similares a los obtenidos por otros autores, en el caso de Mena, Peña & Gonzáles (2003) y Villamil, Martínez & Pinzón (2015), reportan mortalidades mayores al 70% en varias cepas de *B. bassiana*, tal como las obtenidas en el presente estudio. A diferencia de los autores mencionados, los días transcurridos para la obtención de estos datos fueron menores en este estudio; los resultados de mortalidad fueron tomados 4 y 6 días después de la inoculación, a comparación de 14 días que fueron utilizados en los estudios de otros autores; esto demostraría la efectividad de la cepa utilizada para este bioensayo. En estudios con otros insectos se ha obtenido como resultado el 100% de mortalidad de los mismos en tan solo 92,4 horas o 3,85 días (Bustamante, 2019), similar con el T5 aplicado en este caso, obteniéndose el 100% de mortalidad a partir de día 4.

En cuanto a los valores toxicológicos de interés,  $DL_{50}$ ,  $CL_{95}$  y  $TL_{50}$ , se aplicó un análisis Probit, que consiste en graficar los porcentajes de mortalidad en función del logaritmo de la dosis aplicada o del tiempo que duró el ensayo, luego se procede a determinar la regresión lineal y su ecuación, se busca el punto de corte cuando el valor de mortalidad sea de 50% empleando los valores de la tabla Probit y sustituyendo por Y en la ecuación de la recta (Nereira Delgado, 2017)

En este estudio se han obtenido un valor  $DL_{50}$  de  $2,67 \times 10^4$  conidias/mL que correspondería al tratamiento T2; para el parámetro  $CL_{95}$  se obtuvo un valor de  $1,49 \times 10^6$  correspondiente al tratamiento T4; finalmente para el parámetro  $TL_{50}$  se obtuvo un valor de 4,02 días. Estos valores se pueden comparar con otros autores como en el caso de Malpartida-Zevallos, Narrea & Dale (2013) que obtuvo un  $DL_{50}$  de  $9,39 \times 10^6$  y una  $CL_{95}$  de  $1,42 \times 10^8$

conidias/mL, la comparación con estos valores podrían indicar un alto nivel de eficacia por parte de la cepa de *B. bassiana* utilizada en este estudio, puesto que en concentraciones inferiores puede generar mayor mortalidad en los individuos de *P. vorax*. En el caso de Brenes (2020), se obtuvieron los valores de CL50 entre  $4,9 \times 10^5$  y  $3,6 \times 10^7$ , por lo que igualmente requieren concentraciones superiores en la suspensión de esporas para generar mortalidad en el 50% de población; afirmando una vez más la efectividad de la cepa utilizada en nuestro estudio.

En cuanto al tiempo de mortalidad, este es muy similar a los obtenidos por otros autores, como es el caso de Ruíz, Rosado & Cupul (2009), quienes obtuvieron un valor de TL<sub>50</sub> de 3,6 días; o en el caso de Brenes (2020) quien sustenta que su TL<sub>50</sub> varía entre 1 y 4 días. Igualmente, Muñoz, Rosa & Toledo (2009) obtuvieron un valor de TL<sub>50</sub> de 3,83 días, muy aproximado al obtenido en este bioensayo.

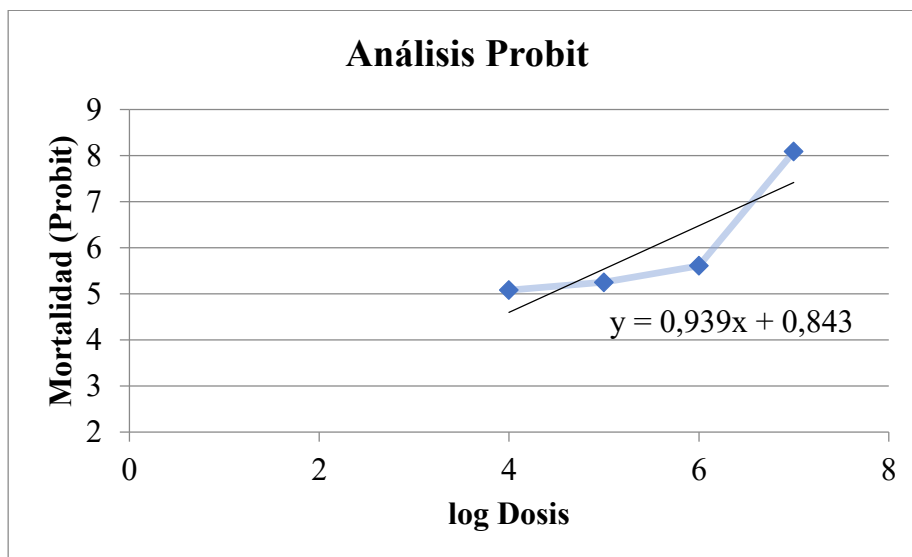


Gráfico 4. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de *P. vorax* según las variables dosis - respuesta.

**Fuente:** autora: programa Excel

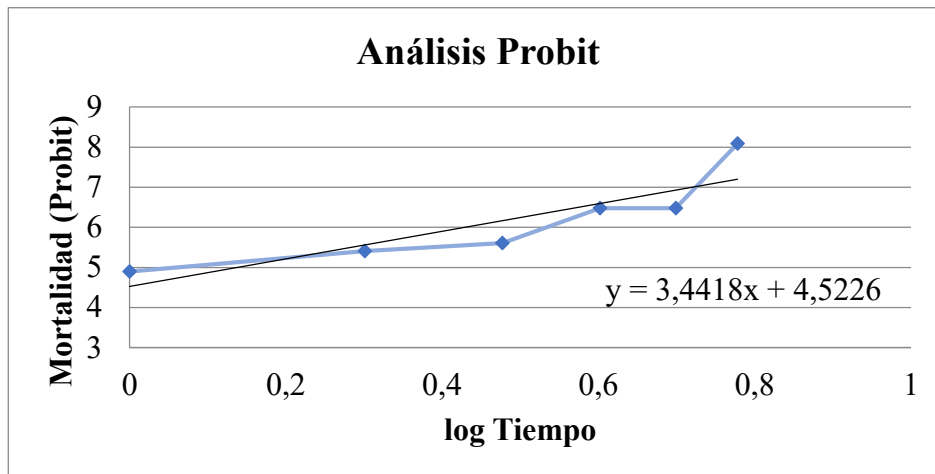


Gráfico 5. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de *P. vorax* según las variables tiempo - respuesta.

**Fuente:** autora: programa Excel

La presente investigación ha generado datos que permiten calificar a la cepa de *B. bassiana* aislada de su entorno natural, como un candidato efectivo para entomopatógeno y controlador biológico bajo condiciones controladas de laboratorio y bajo experimentación *in vitro*. La relación positiva que se ha evidenciado entre dosis/efecto permite facilitar los cálculos para su uso, puesto que a partir de una concentración de  $1 \times 10^4$  ya se puede evidenciar su eficacia al acabar con el 50% de la población de *P. vorax*, y en concentraciones superiores, como  $1 \times 10^7$  se puede lograr una mortalidad del 100% de la población en tan solo 4 días, tomando como referencia una población pequeña debido a la disponibilidad de la plaga y la manipulación a la que fue sometida, la misma que generó en muchos individuos, la muerte prematura.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

La cepa de *Beauveria bassiana* proveniente de la provincia del Cañar, aislada de su entorno natural, ha demostrado altos niveles de eficiencia y también tolerancia ante los cambios en su entorno habitual, pues tal como se ha mencionado en la teoría, es un hongo muy versátil capaz de resistir y crecer dentro de un amplio rango de temperatura, humedad relativa, además de su capacidad para tomar nutrientes de su entorno en base a los recursos de los que dispone.

La cepa se desarrolló en perfectas condiciones bajo una temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , con una humedad relativa del 60%, como medio nutritivo se empleo PDA en cajas Petri selladas; bajo estas condiciones el hongo desarrolló sus estructuras características de la especie, tales como color, textura, tamaño, forma, elevación, etc.; del mismo modo a nivel microscópico, se observaron hifas de hialinas, conidióforos agrupados de forma circular-ovalada, raquis en forma de zig-zag y conidios en forma de globos. Presentó una TDR de  $3,06 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$  y un porcentaje de germinación de 95%, estas características las encasillan como una cepa candidata para controlador biológico y como entomopatógeno de calidad.

En cuanto a los resultados del bioensayo para la mortalidad generada en gusanos de *P. vorax* se demostró la capacidad entomopatógena de *B. bassiana* ocasionando la muerte del 100% de individuos utilizados en la unidad experimental después de 4 días de la inoculación con el hongo a una concentración de  $1 \times 10^7$ . En concentraciones inferiores se obtuvieron valores de mortalidad entre 40% al 80% al cuarto día y entre 60% al 90% para el sexto día. Visualmente se pudo evidenciar

la pérdida de motilidad y la aparición de estructuras fúngicas blancas similares a algodón alrededor del insecto ya paralizado.

Los valores toxicológicos obtenidos mediante el análisis Probit fueron los siguientes; para  $DL_{50}$  un valor de  $2,67 \times 10^4$  conidias/mL, para  $CL_{95}$  se obtuvo un valor de  $1,49 \times 10^6$  conidias/mL y finalmente para  $TL_{50}$  se obtuvo un valor de 4,02; los valores fueron más bajos en relación a los obtenidos por otros autores, pero esto puede deberse a la cantidad de individuos utilizados en el experimento; en este caso fueron de 5 por cada tratamiento y en la mayoría de experimentos de otros autores se utiliza el doble, 10 individuos por tratamiento. Tomando en cuenta este factor, se puede determinar que los valores obtenidos se relacionan con los de diferentes autores que afirman la efectividad de *B. bassiana* como biocontrolador de *P. vorax*.

En base a lo establecido en la hipótesis, se puede definir que se ha cumplido con la hipótesis alternativa que establece que el hongo *B. bassiana* presenta actividad entomopatógena sobre el gusano blanco de la papa *P. vorax*.

## **5.2. Recomendaciones**

El estudio se llevó a cabo con una cepa originaria de Cañar, una provincia caracterizada por altos niveles de producción de papas, por lo que se podría augurar que el tratamiento de *P. vorax* con *B. bassiana* a nivel de campo sería efectivo ya que se desarrollaría en su entorno nativo, probablemente mejoraría su porcentaje de germinación, a comparación de obtenido en condiciones *in vitro*, tomando en cuenta también que es un hongo saprófito, patógeno y simbiote; capaz de aprovechar diversas fuentes de nutrientes para sobrevivir sin generar consecuencias negativas.

Sin embargo, para garantizar la efectividad de este tratamiento es necesario realizar pruebas de campo abierto, utilizando como objeto de estudio un terreno delimitado donde se siembre papa; así como estudiar a mayor profundidad los efectos y como se relaciona la presencia simultánea de papas con el hongo *B. bassiana*, a pesar de que existen estudios que reportan que la presencia del hongo *B. bassiana* no perjudican a su entorno, ni a la variedad de papa cultivada.

Tal como se ha mencionado, es importante que se continúe estudiando a nivel molecular el mecanismo de acción del hongo sobre el hospedero, puesto que en base a estos datos se podría establecer una cepa que sea más efectiva, más eficiente y que se adapte fácilmente a nuevas condiciones de su entorno sin perder sus atributos patogénicos. En este caso, se podría comparar efectividades de diferentes cepas nativas de Cañar, para asegurar su adaptabilidad al entorno y determinar la cepa más efectiva.



## REFERENCIAS

- Acevedo, V. (2015). *Evaluacion de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum sobre nemátodos parásitos del melón; Huité, Zacapa* [Universidad Rafael Landívar].  
<https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Afandhi, A., Widjayanti, T., Emi, A. A. L., Tarno, H., Afiyanti, M., & Handoko, R. N. S. (2019). Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1186/S40538-019-0148-1>
- Antonio, N., González, M., & Honduras, Z. (2008). *Evaluación de ocho cepas de Beauveria bassiana para control de broca del café Hypothenemus hampei* [Zamorano].  
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5478/1/CPA-2008-T043.pdf>
- Asociación Geoinnova. (2016). *Geoinnova. Fertilizantes Con Nitrógeno y Sus Impactos Ambientales*.
- Ayala M, Montesinos M, & Berlanga A. (2012). *Ficha Técnica CB-27: Cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos*. SENASICA.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172904/Ficha\\_CB\\_27\\_Cultivos\\_monosp\\_ricos\\_de\\_hongos\\_entomopat\\_genos.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172904/Ficha_CB_27_Cultivos_monosp_ricos_de_hongos_entomopat_genos.pdf)
- Baldiviezo, L. V., Pedrini, N., Santana, M., Mannino, M. C., Nieva, L. B., & Gentile, A. (2020). Isolation of *Beauveria bassiana* from the chagas disease vector *Triatoma infestans* in the gran chaco region of argentina: assessment of gene expression during host-pathogen interaction. *J. Fungi*, 6, 219. <https://doi.org/10.3390/jof6040219>

- Basantes, F., Aragón Suárez, J. P., Albuja Illescas, L. M., & Vásquez Hernández, L. del R. (2020). Diagnóstico de la situación actual de la producción y comercialización de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en la Zona 1 del Ecuador. *E-Agronegocios*, 6(2), 103–120.  
<https://doi.org/10.18845/ea.v6i2.5103>
- Brenes, H. (2020). *Evaluación in vitro de la capacidad patogénica de aislamientos nativos del hongo Beauveria bassiana como agentes de control biológico hacia el insecto Zabrotes subfasciatus* [Universidad Nacional ].  
[https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/19626/TFG\\_Hillary Brenes Monge.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/19626/TFG_Hillary%20Brenes%20Monge.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Bustamante, R. (2019). *Evaluación de Beauveria bassiana en el control biológico de larvas de la polilla Oidaematophorus espeletiae* [Universidad de La Salle].  
<https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>
- Bustamante R., R. A. (2019). Evaluación de Beauveria bassiana en el control biológico de larvas de la polilla Oidaematophorus espeletiae. *Tesis de Pregrado*.  
<https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>
- Bustillo, E. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. In *Uso de entomopatógenos en Colombia* (1st ed., pp. 30–54). Comité Regional de Cundinamarca Socolem.  
[https://www.researchgate.net/publication/275462138\\_HONGOS\\_EN\\_INSECTOSy\\_POSIBILIDADES\\_DE\\_USO\\_EN\\_EL\\_CONTROL\\_BIOLOGICO\\_DE\\_PLAGAS\\_EN\\_COLOMBIA](https://www.researchgate.net/publication/275462138_HONGOS_EN_INSECTOSy_POSIBILIDADES_DE_USO_EN_EL_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_EN_COLOMBIA)
- A

- CABI. (2001, August 1). *Premnotrypes vorax*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Pests; CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/DMPP/20066600623>
- CABI. (2022). *Beauveria bassiana* (white muscardine fungus).  
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/8785#todistributionDatabaseTable>
- Calvache Guerrero, H., & Alvarado, F. (1980). El gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) y su control. *Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)*, 34.
- Calvo, M. de la C., & Mendoza, E. (2012). *Toxicología de los alimentos*. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.
- Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. (1999). *FICHA TÉCNICA CB-03 USO DE Beauveria bassiana COMO INSECTICIDA MICROBIAL*.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172882/Ficha\\_CB\\_03\\_Beauveria\\_bassiana.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172882/Ficha_CB_03_Beauveria_bassiana.pdf)
- Charnley, A. K. (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. *LOMER, C.J., PRIOR, C.*, 191–199. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9124433>
- Charnley, K. (2003). Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40, 241–321. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)40006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40006-3)
- Chingal, E. (2017). *Evaluación de controladores biológicos en trampas como alternativa para el combate del gusano blanco (Premnotrypes vorax) en papa (Solanum tuberosum) en el Centro Experimental San Francisco, Huaca – Carchi – Ecuador [UPEC]*.

<http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/575/1/328> Evaluación de controladores biológicos en trampas como alternativa para el combate.pdf

Chirinos, D. T., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Peñarrieta Bravo, S., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2019). Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(1), 1–16.  
[https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num1\\_art:1276](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276)

CIP. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS* (V. Cañedo & T. Ames (eds.)). CIP. [www.cipotato.org](http://www.cipotato.org)

CONPAPA. (2017, June 12). *Las papas, la nutrición y la alimentación*. Las Papas, La Nutrición y La Alimentación. <https://www.conpapa.org.mx/index.php/blog/item/8-las-papas-la-nutricion-y-la-alimentacion>

Delgado, Nereida. (2016). *Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis Probit*. Universidad Central de Venezuela.  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia3/Clase\\_practica\\_control\\_microbiologico\\_FMIIP\\_2016.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Clase_practica_control_microbiologico_FMIIP_2016.pdf)

Delgado, Nereira. (2017). *EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN INSECTICIDA BIOLÓGICO MEDIANTE ANÁLISIS PROBIT*. In *Práctica*. Universidad Central de Venezuela; Facultad de Agronomía.  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia3/Metodos\\_para\\_realizar\\_Analisis\\_Probit\\_-\\_GUÍA.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Metodos_para_realizar_Analisis_Probit_-_GUÍA.pdf)

- Difco, & BBL. (1973). *Manual of Microbiological Culture Media* (M. Zimbardo & D. Power (eds.); Fifth). Becton, Dickinson and Co. <http://www.sanilabo.com/wp-content/uploads/2019/01/Manual-medios-BD.pdf>
- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Kulmanbetova, A., Zholdosbekova, S., & Amanbek Kyzy, A. (2019). Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 167, 107243. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2019.107243>
- ECHA. (2021). *Dinitrogen oxide - Substance Information - ECHA*. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.030.017>
- El Universo. (2020). *Plagas y factores climáticos continúan afectando la producción de papa | Economía | Noticias | El Universo*. <https://www.eluniverso.com/noticias/2020/07/08/nota/7899012/ecuador-tiene-550-variedades-papa-se-estudian-mas-posibilidades>
- EPPO. (2022). *Premnotrypes vorax (PREMVO)[Datasheet]*. EPPO Datasheets on Pests Recommended for Regulation. . <https://gd.eppo.int/taxon/PREMVO/datasheet>
- Ergio, S. E., Alves, B., Rossi, L. S., Erio, R. E., Lopes, B., Tamai, M. A., & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J Invertebr Pathol*. [www.academicpress.com](http://www.academicpress.com)
- Esparza, M., Contreiro, A., & Fraga, M. (2017). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Agricultural Microbiology*, 84, 1–10. <https://www.scielo.br/j/aib/a/7RCCHwZ4YhQWpdVVZfJ6LXG/?format=pdf&lang=en>

- Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N. O., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., & Tong, S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(9), E1578–E1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616543114>
- FAO. (2009). *Cómo alimentar al mundo 2050* (Issue 1).
- Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. (2015). Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *112*, 11365–11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503200112>
- Fernández, J. (2020). *Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana sobre la broca del café (Hypothenemus hampei)*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *26*(2003), 155–171. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000200009](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200009)
- Gallegos, P., Avalos, G., & Castillo, C. (1998). *El gusano blanco de la papa en Ecuador comportamiento y control* (INIAP (ed.)).
- García, M., Cappello, S., Leshner, J., & Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beuvaeria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, *10*, 21–28. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457845138002>
- Godoy, J. ., Valera, R. ., Guédez, C., Cañizalez, L. ., & Castillo, C. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de

- Beauveria bassiana. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 24(3), 415–425.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182007000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2017). MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. *Laboratorio de Entomopatógenos SCB - SENASA*. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Usode-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>
- Huanes-carranza, J. (2017). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. *Rebiol*, 36(1), 51–58.
- Humber, R. A. (2005). *Entomopathogenic Fungal Identification updated November 2005* (USDA-ARS). US Plant, Soil & Nutrition Laboratory. <http://arseq>.
- INEC- ESPAC. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2019*. [shorturl.at/lry58](http://shorturl.at/lry58)
- INEC. (2016). Información Ambiental en la Agricultura 2016. *Información Ambiental En La Agricultura*, 1–34. [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/Informacion\\_ambiental\\_en\\_la\\_agricultura/2016/PRESENTACION\\_AGRO\\_AMBIENTE\\_2016.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf)
- INIAP. (2019). *MANEJO INTEGRADO DEL GUSANO BLANCO DE LA PAPA Premnotrypes*

*vorax* H. EN EL ECUADOR.

<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5136/1/iniapscmt93.pdf>

Kühne, M. (2007). *The Andean potato weevil Premnotrypes suturicallus Ecology and interactions with the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana.*

Kuschel, G. (1956). REVISION DE LOS PREMNOTRYPINI Y ADICIONES A LOS RAGOINI.

Landázuri, P., Gallegos, P., & Barriga, E. (2005). Control in vitro de *Premnotrypes vorax* (Hustache) con aislamientos de *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. *Boletín Técnico 5, Serie Zoológica 1, 5*, 51–58. <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/revista-serie-zoologica/article/view/1388/979>

Lopes, R. B., Faria, M., Glare, T. R., Rogerio, C., & Lopes, B. (2018). *A nonconventional two-stage fermentation system for the production of aerial conidia of entomopathogenic fungi utilizing surface tension.* <https://doi.org/10.1111/jam.14137>

Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M., & Dale-Larraburre, W. (2013). PATOGENICIDAD DE *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., SOBRE EL GUSANO DEFOLIADOR DEL MARACUYÁ *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) EN LABORATORIO. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75–82. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v12n2/a02v12n2>

Mannino, M. C., Paixão, F. R. S., & Pedrini, N. (2019). The limpet transcription factors of *Triatoma infestans* regulate the response to fungal infection and modulate the expression pattern of defensin genes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 108, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.010>

Mena, S., Peña, L., & Gonzáles, R. (2003). CL 50 y variación de la patogenicidad en



aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* evaluados en poblaciones de *Premnotrypes vorax*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4(1), 49–54.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449953024007>

Ministerio de Salud Pública. (2019). *Subsistema de vigilancia SIVE- ALERTA Tóxicos y Químicos*. 2017, 1–3.

Montesdeoca, F., Panchi, N., Navarrete, I., Pallo, E., Yumisaca, F., Taípe, A., Espinoza, S., & Andrade-Piedra, J. (2013). *Guía Fotográfica de las Principales Plagas del Cultivo de la Papa en Ecuador*. <https://doi.org/10.4160/978-92-9060-423-5>

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 95–103. <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

Muñoz, J., Rosa, W., & Toledo, J. (2009). MORTALIDAD EN CERATITIS CAPITATA (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) POR DIVERSAS CEPAS DE BEAUVERIA BASSIANA (BALS.) VUILLEMIN, EN CONDICIONES DE LABORATORIO. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3), 609–624.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57512077013>

Naranjo, A. (2017). La otra guerra: la situación de los plaguicidas en el Ecuador. In *Agencia Ecologista de Información - Tegantai* (Issue 9).

<http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/245180/245180.pdf>  
<https://hdl.handle.net/20.500.12380/245180>  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003>  
<https://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001>  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12>

- Naranjo, R. P. (2008). Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Tecnología En Marcha*, 21(1), pág. 123-132. [http://www.tecdigital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec\\_marcha/article/view/1345](http://www.tecdigital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec_marcha/article/view/1345)
- Navarro Mejía, O. (1995). *Estudio de algunos aspectos biológicos y de comportamiento del gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax Hustache)*. Universidad Nacional de Colombia.
- NCSS Data Analysis. (2022). *Probit Analysis*. NCSS. [https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Probit\\_Analysis.pdf](https://ncss-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Probit_Analysis.pdf)
- O. Beys, W., Santi, L., Schrank, A., & H. Vainstein, M. (2009). Metarhizium anisopliae lipolytic activity plays a pivotal role in Rhipicephalus (Boophilus) microplus infection. *Funga Biology*, 114, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.08.003>
- Ortiz-Urquiza, A. (2021). The Split Personality of Beauveria bassiana: Understanding the Molecular Basis of Fungal Parasitism and Mutualism. *MSystems*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00766-21/ASSET/EC07EF6F-4AE4-43BE-868A-985D0B7170DA/ASSETS/IMAGES/MEDIUM/MSYSTEMS.00766-21-F002.GIF>
- Pal, S., St. Leger, R. J., & Wu, L. P. (2007). Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in Drosophila melanogaster. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8969–8977. <https://doi.org/10.1074/JBC.M605927200>
- Peña, L. A., Bolaños, M., Yépes, B., Mena, J., & Enríquez, J. (2006). *HONGOS ENTOMOPATOGENOS PARA EL MANEJO DEL GUSANO BLANCO (Premnotrypes vorax) DE LA PAPA* (Corpoica, Vol. 15). Corpoica.

[http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6430/1/Hongos entomopatogenos para el manejo del gusano blanco.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6430/1/Hongos%20entomopatogenos%20para%20el%20manejo%20del%20gusano%20blanco.pdf)

Pierce, W. D. (1914). New Potato Weevils From Andean South America. *Journal of Agricultural Research*, 1(347), 347–351.

Resh, V., & Carde, R. (2009). *Encyclopedia of Insects* (2nd ed.). Elsevier's Science & Technology.

<https://drive.google.com/file/d/1uyBS2fpOCEL3L7by1lmAvwsRS6kS0hAA/view>

Reyes, E. R. (2016). *Introducción a la toxicología*. UNAM. [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxicologia18.pdf?fbclid=IwAR3Nm5D\\_XljtbiqFmFJJHKQdmYrDFiDJMUeMO6LYbY2dFp81E10Oiyrn2E](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Toxicologia18.pdf?fbclid=IwAR3Nm5D_XljtbiqFmFJJHKQdmYrDFiDJMUeMO6LYbY2dFp81E10Oiyrn2E)

Ruiz Sánchez, E., Rosado Calderón, A. T., Cupul, W. C., Alejo, J. C., & Rosales, R. M. (2009).

PATOGENICIDAD DE BEAUVERIA BASSIANA (BALS.) VUILLEMIN SOBRE ESTADOS INMADUROS DE MOSQUITA BLANCA (BEMISIA TABACI GENN.). *FITOSANIDAD*, 13(2), 89–94. <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v13n2/fit03209.pdf>

SAG Chile. (2005). INFORMATIVO FITOSANITARIO Gorgojo de la papa. *Gobierno de Chile*, 4–6.

Salazar, E. (1997). *Biología y comportamiento del gusano blanco de la papa (Premnotrypes vorax, Hustache)*.

SERMARNAT, & INE. (2008). *Manual de biología de suelos tropicales: Muestreo* (F. Moreira, J. Huising, & D. Bignell (eds.); INE). INE.

[http://189.240.101.244:8080/xmlui/bitstream/handle/publicaciones/217/667\\_2012\\_Manual\\_biologia\\_suelos\\_tropicales.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://189.240.101.244:8080/xmlui/bitstream/handle/publicaciones/217/667_2012_Manual_biologia_suelos_tropicales.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Suntaxi, G. (2019). *Efectos y síntomas de productos agroquímicos en trabajadores*.

Torres, L., Gallegos, P., Castillo, C., & Asaquibay, C. (2011). *Manejo del gusano blanco*. CIP-INIAP. <https://cipotato.org/papaenecuador/manejo-de-gusano-blanco/#:~:text=El gusano blanco Premnotrypes vorax,altos niveles de pérdida económica>.

UAGro. (2014). *Ventajas, limitaciones y costos del control biológico*.

UniProt. (2022). *Beauveria bassiana (White muscardine disease fungus) (Tritirachium shiotae)*. <https://www.uniprot.org/taxonomy/176275>

Valencia, L. (2016). El gusano blanco de la papa. *Premnotrypes vorax* (Hustache) en Colombia.

I.- Comportamiento de adultos en el campo. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 2(1), 57–70. <https://doi.org/10.37066/ralap.v2i1.22>

Villamil, J. E., Martínez, J. W., & Pinzón, E. H. (2015). Actividad entomopatogénica de aislamientos autóctonos de *beauveria* spp. sobre *premnnotrypes vorax* (hustache) in vitro. *Temas Agrarios*, 20(1), 19–33. <https://doi.org/10.21897/RTA.V20I1.745>

Vinson, S. B. (1991). Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. *PATHAK, J.P.N.*, 171–187.

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Frontiers in Microbiology*, 12, 2375. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.705343/BIBTEX>

Wang, J., Ying, S. H., Hu, Y., & Feng, M. G. (2016). Mas5, a homologue of bacterial DnaJ, is

indispensable for the host infection and environmental adaptation of a filamentous fungal insect pathogen. *Environ. Microbiol.*, 18, 1037–1047. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13197>

## ANEXOS

### Anexo 1. Recolección del material biológico

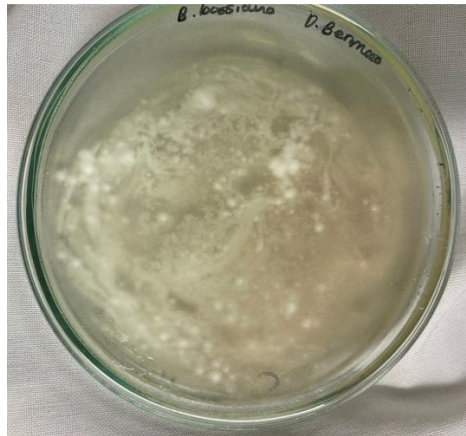
Recolección del material biológico en la provincia de Cañar.



*Figura 6. Premnotrypes en el tubérculo*

**Fuente:** autora

### Anexo 2. Siembra de *B. bassiana* a partir de *P. vorax*



*Figura 7. Siembra primaria de B. bassiana tomado de P. vorax*

**Fuente:** autora

### Anexo 3. Cultivo monospórico de *B. bassiana*

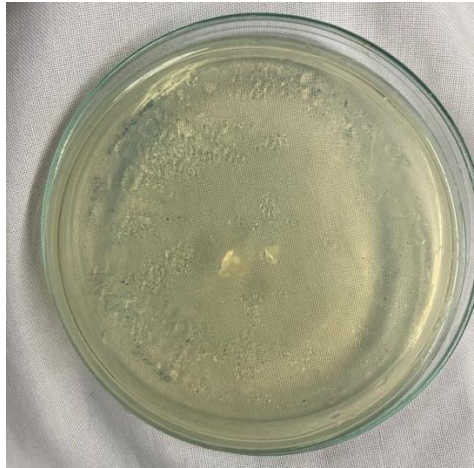


Figura 8. Siembra de una colonia de *B. bassiana* para obtener un cultivo monospórico

Fuente: autora

### Anexo 4. Bioensayos de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. vorax*

Gusanos de *P. vorax* después de haber sido desinfectados y retirado el exceso de humedad sobre tela estéril.



Figura 9. Preparación de bioensayos: Desinfección de *P. vorax* y retiro de exceso de humedad

Fuente: autora



*Figura 10. Unidad experimental*

**Fuente:** autora

### **Anexo 5. Distintas etapas de desarrollo de *P. vorax***



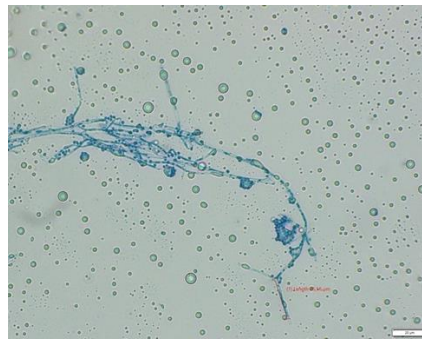




*Figura 11. Etapas de desarrollo de P. vorax*

**Fuente:** autora

#### **Anexo 6. Caracterización macroscópica y microscópica de *B. bassiana***



*Figura 12. Estructuras de B. bassiana bajo el microscopio (40x)*

**Fuente:** autora

**Anexo 7. Resultados de bioensayos: *B. bassiana* sobre *P. vorax***



*Figura 13. Ataque de B. bassiana sobre P. vorax en su etapa de gusano y adulto*

**Fuente:** autora