



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN PATOGENICA DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* PARA EL BIOCONTROL DEL *Cosmopolites sordidus* EN CULTIVOS DE BANANO.

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES: Francisco Xavier Pólit Solórzano

Zynnica Leonor Echeverria Vergara

TUTORA: MSc. Johanna Alexandra Solórzano Muñoz.

Guayaquil-Ecuador

2023

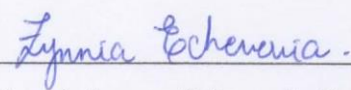
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Zynnia Leonor Echeverria Vergara con documento de identificación N° 0926480773 y Francisco Xavier Pólit Solórzano con documento de identificación N° 0926416124; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos 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.

Guayaquil, 04 de septiembre del año 2023

Atentamente,



Zynnia Leonor Echeverria Vergara
0926480773



Francisco Xavier Pólit Solórzano
0926416124

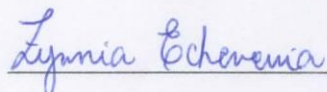
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Zynnia Leonor Echeverría Vergara con documento de identificación No. 0926480773 y Francisco Xavier Pólit Solórzano con documento de identificación No. 0926416124, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: "EVALUACIÓN PATOGÉNICA DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* PARA EL BIOCONTROL DEL *Cosmopolites sordidus* EN CULTIVOS DE BANANO.", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

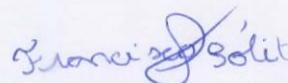
Guayaquil, 04 de septiembre del año 2023

Atentamente,



Zynnia Leonor Echeverría Vergara

0926480773



Francisco Xavier Pólit Solórzano

0926416124

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Johanna Alexandra Solórzano Muñoz con documento de identificación N° 0917391534, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN PATOGENICA DE *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* PARA EL BIOCONTROL DEL *Cosmopolites sordidus* EN CULTIVOS DE BANANO, realizado por Zynnia Leonor Echeverria Vergara con documento de identificación N° 0926480773 y por Francisco Xavier Pólit Solórzano con documento de identificación 0926416124, 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.

Guayaquil, 04 de septiembre del año 2023

Atentamente,



Msc. Johanna Alexandra Solórzano Muñoz

C.I.: 0917391534

Dedicatoria

Quiero dedicar mi tesis a Dios por permitirme seguir adelante con fe a pesar de los obstáculos que se presentan en la vida. A mis padres que son la inspiración y el motor de mi vida. El Dr. Ing. Leonardo Echeverria Fabre, quién aparte de ser mi padre, es mi ejemplo a seguir y mi héroe. A mi mamá Zynnia Vergara, quién es mi mejor amiga, mi consejera y mi luz.

A mis hermanos Gabriel Vargas y la Ing. Verónica Vargas, quiénes siempre han tenido fe en el fruto de mis esfuerzos apoyándome y alentando me a ser mejor en cada etapa de mi vida.

Al Ing. Félix Chávez, quién ha sido mi compañero y mi mejor amigo, la persona que ha estado incondicionalmente conmigo en las buenas y en las malas. A mi abuelita Yiye y a mi tío Francisco Vergara que se encuentra desde el cielo observando cada paso que doy. A mis mascotas Jackie, Loki, Izzy y Blacky por su amor incondicional.

Zynnia Leonor Echeverria Vergara

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a mis padres Francisco Pólit Corral y María de Lourdes Solórzano, así como mis hermanas María Gabriela, Ana Cristina y Maluli Pólit por haberme brindado el cariño de una familia bajo la cual he vivido momentos inolvidables que me han marcado y me han forjado como persona.

Por todo el apoyo que he recibido de cada uno de ustedes en cada etapa de mi vida y por haberme visto crecer en todo sentido.

Francisco Xavier Pólit Solórzano

Agradecimiento

Quiero Agradecer a mis padres el Dr. Ing Leonardo Echeverria y Zynnia Vergara por su apoyo físico, emocional y económico en cada etapa de mi vida, a mis hermanos Verónica Vargas y Gabriel Vargas por creer en mí y mis capacidades, a Darío Bernal por enseñarme cuando estaba más chiquita, a Félix Chávez por estar conmigo en cada momento y enseñarme con paciencia las cosas. Gracias a ustedes soy la mejor versión de mí, y puedo crecer cada día como profesional y como persona, este logro no lo hubiera podido hacer sin ustedes. Los amo con cada célula que compone mi cuerpo.

A todos los docentes que a lo largo de mi tiempo en la universidad compartieron su conocimiento conmigo brindándome sabiduría y apoyo en los momentos difíciles.

A mi tutora la Blga. Johanna Solórzano por ser una guía en este proyecto, más que una maestra, ha sido una amiga para mí, gracias por su paciencia y dedicación.

Al Ing. Jaime Naranjo por haber sido una inspiración en este proyecto. Al Ing. Kevin Cedeño por su ayuda y paciencia en la metodología.

A la Ing. Anggie Auz quién ha sido una linda amistad que me dió la universidad, quién siempre estuvo dispuesta a ayudar a lo largo de este proyecto. A la Blga. Carla Zamora por su aporte y ayuda durante la metodología.

Al señor José Luis Naranjo por su paciencia y disposición de ayudarnos. A mi compañero de tesis Francisco Pólit, quien ha sido un gran amigo desde primer semestre y me ha apoyado en todo momento hasta el final de esta etapa. A mis compañeros y colegas que me apoyaron e hicieron más llevadera la experiencia de la universidad.

Zynnia Leonor Echeverria Vergara

Agradecimiento

A mis padres por su constante apoyo a nivel moral y económico, ya que gracias a ellos he podido crecer como persona y lograr este objetivo tan importante en mi vida.

Al resto de mi familia, hermanas, abuelos, tíos, primos y demás, que me han visto crecer y con quienes he pasado momentos altos y bajos que me han marcado de forma positiva para ser quien soy actualmente.

A todos mis amigos, por aquellos momentos extraordinarios que hemos vivido juntos y por el apoyo mutuo durante tantos años. En especial a mi compañera de tesis Zynnia Echeverría, quien ha sido una amiga invaluable desde que comenzó la carrera y con quien he compartido grandes momentos, agradeciendo su dedicación y colaboración durante todo este proceso de titulación.

A todos los docentes por compartir su excelente conocimiento para la formación de futuros y exitosos profesionales. En particular, quiero agradecer a la profesora Johanna Solórzano por haber sido una guía y apoyo durante todo el proceso como tutora, al profesor Jaime Naranjo por su aporte de ideas e inspiración del cuál nació este tema de investigación y al ingeniero Kevin Cedeño cuya colaboración y ayuda que fue esencial para finalizar el proyecto.

Adicionalmente, un agradecimiento para Angie Auz y Carla Zamora por su aporte como encargadas de laboratorio proporcionando el material necesario y al señor José Luis Naranjo por su apoyo en la recolección de los especímenes de picudo utilizados en este trabajo.

Francisco Xavier Pólit Solórzano

Resumen

Cosmopolites sordidus es un coleóptero considerado como una de las plagas con mayor incidencia negativa en los cultivos de banano. Su control se realiza mediante la aplicación de sustancias químicas con potenciales efectos negativos al ecosistema, de ahí que, el uso de hongos entomopatógenos ha surgido como una alternativa de control más favorable para el medio ambiente. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del picudo negro en el cultivo de banano. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana, campus María Auxiliadora, sede Guayaquil. Se utilizaron cepas de uso comercial de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con una concentración de 1×10^8 . Se realizaron 12 tratamientos que consistieron en cuatro grupos divididos en un grupo control y otros tres, que consistieron en ejemplares infectados por *B. bassiana*, *M. anisopliae*, y una combinación de ambas; cada uno de ellos fue infectado con tres concentraciones diferentes de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 . El tratamiento que proporcionó la mayor tasa de mortalidad en un período de 30 días fue el combinado con un 64,07%, seguido de los individuos infectados por *B. bassiana* con un 30,74% y *M. anisopliae* con el 21,48%. Por otro lado, la concentración 1×10^7 obtuvo la mejor eficacia con 83,33%, mientras que, la concentración 1×10^8 y 1×10^6 fueron eficaces en un 50 y 28,33% respectivamente. Los resultados demuestran que existe un sinergismo en el uso combinado de hongos entomopatógenos permitiendo potenciar el proceso infeccioso sobre especímenes de picudo negro en comparación con el uso de cepas individuales. En conclusión, la inoculación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el *C. sordidus* es una alternativa prometedora y sostenible para el manejo de esta plaga. Estos hongos entomopatógenos ofrecen una solución eficaz y respetuosa con el medio ambiente para controlar al picudo negro, preservando la calidad del suelo y los cultivos, principalmente de banano.

Palabras clave: Entomopatógeno, picudo negro, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, patogenicidad.

Abstract

Cosmopolites sordidus is a beetle considered one of the pests with the highest negative impact on banana crops. Its control is carried out through the application of chemical substances with potential negative effects on the ecosystem, hence the use of entomopathogenic fungi has emerged as a more favorable control alternative for the environment. The objective of this research was to evaluate the pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for the biological control of the black weevil in banana cultivation. The study was carried out at the facilities of the Salesian Polytechnic University, María Auxiliadora campus, Guayaquil campus. Commercial strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* were used with a concentration of 1×10^8 . About 12 treatments were carried out consisting of four groups divided into a control group and another three, which consisted of specimens infected by *B. bassiana*, *M. anisopliae*, and a combination of both; each one of them was infected with three different concentrations of 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 . The treatment that provided the highest mortality rate in a 30-day period was the combination with 64.07%, followed by individuals infected with *B. bassiana* with 30.74% and *M. anisopliae* with 21.48%. On the other hand, the 1×10^7 concentration obtained the best efficacy with 83.33%, while the 1×10^8 and 1×10^6 concentrations were 50 and 28.33% effective, respectively. The results show that there is a synergism in the combined use of entomopathogenic fungi, allowing to enhance the infectious process on weevil specimens compared to the use of individual strains. In conclusion, the inoculation of *B. bassiana*. and *M. anisopliae* in *C. sordidus* is a promising and sustainable alternative for the management of this pest. These entomopathogenic fungi offer an effective and environmentally friendly solution to control the black weevil, preserving the quality of the soil and crops, mainly bananas.

Keywords: Entomopathogenic, black weevil, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	20
1. INTRODUCCIÓN.....	20
<i>1.1. Antecedentes</i>	<i>20</i>
<i>1.2. Problema de la investigación.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3. Pregunta de investigación</i>	<i>22</i>
1.4. Objetivos.....	22
<i>1.5. Hipótesis</i>	<i>22</i>
<i>1.6. Justificación</i>	<i>22</i>
<i>1.7. Delimitación</i>	<i>23</i>
CAPITULO II	24
2. MARCO TEÓRICO	24
<i>2.1. Banano (Musca paradisiaca)</i>	<i>24</i>
<i>2.2. Picudo negro (Cosmopolites sordidus)</i>	<i>25</i>
<i>2.3. Métodos de control.....</i>	<i>29</i>
<i>2.4. Trampas.....</i>	<i>30</i>
<i>2.5. Hongos entomopatógenos</i>	<i>31</i>
<i>2.6. Beauveria bassiana</i>	<i>33</i>
<i>2.7. Metarhizium anisopliae</i>	<i>36</i>
<i>2.8. Cortes anatómicos.....</i>	<i>38</i>

2.9. Cortes histológicos	39
2.10. Análisis Multifactorial	40
2.11. Statgrafics	40
CAPÍTULO III	41
3. MARCO METODOLÓGICO	41
3.1. Nivel de la investigación	41
3.2. Diseño experimental	41
3.3. Ubicación	42
3.4. Diseño de trampas	42
3.5. Recolección de las muestras	43
3.6. Activación de cepas y determinación de la concentración de esporas	44
3.7. Clasificación y esterilización	45
3.8. Infección	46
3.9. Cortes anatómicos	47
3.10. Cortes histológicos	48
3.11. Prueba interespecífica entre cepas	50
3.12. Análisis estadístico	51
CAPÍTULO IV	53
4. Resultados y discusión	53
4.1. Resultados de la muestra control (tratamiento testigo)	53
4.2. Resultados del tratamiento 2 (<i>B. bassiana</i>)	55

4.3.	<i>Resultados del tratamiento 3 (M. anisopliae)</i>	57
4.4.	<i>Resultados del tratamiento 4 (B. bassiana & M. anisopliae)</i>	59
4.5.	<i>Eficacia de los factores (Tratamientos y Concentraciones)</i>	61
4.6.	<i>Resultados del Análisis Multifactorial</i>	63
4.7.	<i>Resultados de la prueba interespecífica entre cepas</i>	68
4.8.	<i>Resultados cualitativos de los tratamientos</i>	69
4.9.	<i>Resultados de cortes anatómicos</i>	76
4.10.	<i>Resultados obtenidos de los cortes histológicos</i>	82
4.11.	<i>Discusión de resultados</i>	86
CAPÍTULO V		88
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	88
5.1.	<i>Conclusiones</i>	88
5.2.	<i>Recomendaciones</i>	88
CAPÍTULO VI		90
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ANEXOS	90
6.1.	<i>Referencias bibliográficas</i>	90
6.2.	<i>Anexos</i>	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas del picudo negro; (A) Picudo negro en posición supina. (B) Picudo negro en posición decúbito lateral. (C) Picudo negro en posición decúbito prono.....	26
Figura 2. Picudos negros en pseudotallos de banano; (A) Picudo negro encontrado en el interior del pseudotallo de banano. (B) Picudos negros alimentándose del pseudotallo de banano.....	27
Figura 3. Efecto colateral causado por el daño del picudo negro; (A & B) Presencia de clorosis en cultivos.....	29
Figura 4. Visualización de la morfología de <i>B. bassiana</i>; (A) Macroscópica. (B) Microscópica.....	35
Figura 5. Visualización de la morfología de <i>M. anisopliae</i>; (A) Macroscópica. (B) Microscópica.....	37
Figura 6. Bananera “San José”; (A) Geolocalización de la finca (2°07'04.8"S 79°28'38.2"W). (B) Vista general de la finca.....	42
Figura 7. Preparación de trampas tipo “Sándwich” para picudo negro; (A & B) Cortes longitudinales en el pseudotallo.....	43
Figura 8. Recolección de especímenes de picudo negro; (A) Abertura de Pseudotallos. (B) Recolección de <i>C. sordidus</i> en recipiente estéril. (C) <i>C. sordidus</i> en el interior de la trampa.....	44
Figura 9. Activación de cepas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>; (A & B) Activación de viales mediante agua peptonada. (C) Viales con cepa de <i>M. anisopliae</i> & <i>B. bassiana</i>....	45

Figura 10. Conteo de esporas; (A) Observación microscópica del hemocitómetro. (B) Disoluciones seriadas. (C) Aplicación "Hemocytometer Sidekick" para determinación de concentraciones.....	45
Figura 11. Clasificación de muestras; (A & B) Selección de especímenes de <i>C. sordidus</i>. (C) Esterilización de las muestras.....	46
Figura 12. Infección de los especímenes de picudo negro; (A & B) Inmersión de los ejemplares en solución de esporas.	47
Figura 13. Cortes anatómicos; (A) Colocación de la muestra en posición adecuada. (B) Incisión en la muestra.	48
Figura 14. Fijación y ablandamiento de las muestras; (A) Muestras remojándose en formalina. (B) Muestras remojándose en hidróxido de potasio.....	48
Figura 15. Preparación de moldes de parafina; (A) Muestras con parafina dentro de la estufa. (B) Micrótopo realizando cortes.	49
Figura 16. Preparación de los cortes histológicos (A) observación de resultados en el estereomicroscopio. (B) Reactivos para tinción de muestra. (C & D) Tejidos de <i>C. Sordidus</i>.....	50
Figura 17. Prueba interespecífica entre cepas; (A) Agar inoculado con cepa <i>B. bassiana</i>. (B) Siembra de Agar con cepa de <i>M. anisopliae</i>.	51
Figura 18. Cantidad de muertes en muestra control.	54
Figura 19. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en muestra control.	54
Figura 20. Mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T2.....	56
Figura 21. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T2... ..	56
Figura 22. Mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T3.....	58
Figura 23. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T3... ..	59

Figura 24. Mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T4.....	60
Figura 25. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de <i>C. sordidus</i> en tratamiento T4..	61
Figura 26. Eficacia de los tratamientos.	62
Figura 27. Eficacia de las concentraciones.....	62
Figura 28 Gráfico de interacciones de factores.	64
Figura 29. Gráfico de medias Tuckey HSD.	65
Figura 30. Gráfico de contraste de cepas	66
Figura 31. Gráfico de análisis del rendimiento de cepas.	67
Figura 32. Gráfico de análisis por nivel para concentraciones.....	68
Figura 33. Crecimiento sinergista de las cepas <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	69
Figura 34. Picudos negros en la primera semana de infección; (A & B) Visualización microscópica del desarrollo inicial de hongos en el picudo negro.	71
Figura 35. Picudos negros en la primera semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.....	71
Figura 36. Picudos negros en la segunda semana de infección; (A) Visualización microscópica de hongos. (B) Presencia de <i>B. bassiana</i>	72
Figura 37. Picudos negros en la segunda semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.....	72
Figura 38. Picudos negros en la tercera semana de infección; (A & B) Visualización microscópica de la presencia de <i>B. bassiana</i> en muestras en la tercera semana.	73
Figura 39. Picudos negros en la tercera semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.....	73
Figura 40. Picudos negros en la cuarta semana de infección; (A & B) Visualización microscópica de <i>C. sordidus</i> en la cuarta semana de infección.	74

Figura 41. Picudos negros en la cuarta semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.....	74
Figura 42. Vista del espécimen en estadio final de infección en el programa Labscope .	75
Figura 43. Anatomía del Picudo Negro Vista Frontal; (A) Pico, (B) Antena, (C) Cabeza, (D) Pata Frontal, (E) Pronoto, (F) Élitro, (G) Tibia, (H) Tarso.....	76
Figura 44. Anatomía del Picudo Negro Vista Posterior; (A) Esternón, (B) Mesoesternón, (C) Metaesternón, (D) Abdomen, (E) Esternitos.....	76
Figura 45. Cabeza del Picudo Negro; (A&B) Antenas, (C) Cabeza, (D) Pico, (E) Cepa de <i>M. anisopliae</i>, (F) Cepa de <i>B. bassiana</i>.....	77
Figura 46. Tórax y Abdomen del Picudo Negro; (A)Protórax, (B)Ala membranosa, (C)Abdomen, (D) Segmentos Abdominales, (E) Cepa de <i>B. bassiana</i>, (F) Cepa de <i>M. anisopliae</i>.....	77
Figura 47. Abertura del Toráx del picudo negro; (A&B) Cepa de <i>B. bassiana</i>.	78
Figura 48. Abertura del Abdomen del picudo negro; (A)Abdomen, (B) Segmentos abdominales, (C) Cepa de <i>B. bassiana</i>.....	78
Figura 49. Órgano Copulador del Picudo Negro (A) Placa Subgenital, (B) Macrosetas, (C) Valva, (D) Cepa de <i>M. anisopliae</i>.	79
Figura 50. Abertura Frontal del Tórax (A) Tórax, (B) Cepa de <i>B. bassiana</i>, (C) Margen carinado.....	79
Figura 51. Visualización posterior de la abertura del tórax; (A) Margen carinado, (B) Pleura, (C) Estructuras membranosas del tórax.....	80
Figura 52. Élitro; (A) Cepa de <i>B. bassiana</i>.	80
Figura 53. Visualización lateral de abertura del abdomen; Mesotórax y Abdomen, (A) Segmentos Abdominales, (B) Cepa de <i>B. bassiana</i>.....	81

Figura 54. Ápice elitral, (A) Cepa de <i>B. bassiana</i>.....	81
Figura 55. Visualización de integumento en un objetivo de 40X.	83
Figura 56. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.	83
Figura 57. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.	84
Figura 58. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.	84
Figura 59. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Musa paradisiaca</i>	24
Tabla 2. Taxonomía de la <i>Cosmopolites sordidus</i>	27
Tabla 3. Ciclo de vida del picudo negro	28
Tabla 4. Taxonomía de la <i>B. bassiana</i>	34
Tabla 5. Condiciones óptimas de crecimiento de la <i>B. bassiana</i>	35
Tabla 6. Taxonomía del <i>Metarhizium anisopliae</i>	37
Tabla 7. Condiciones óptimas de crecimiento de la <i>M. anisopliae</i>	38
Tabla 8. Diseño Factorial Completo	41
Tabla 9. Diseño de tratamientos del proyecto	46
Tabla 10. Cuantificación de <i>C. sordidus</i> muertos en muestra testigo	53
Tabla 11. Cuantificación de <i>C. sordidus</i> muertos en tratamiento T2	55
Tabla 12. Cuantificación de <i>C. sordidus</i> muertos en tratamiento T3	57
Tabla 13. Cuantificación de <i>C. sordidus</i> muertos en tratamiento T4	59
Tabla 14. Análisis de varianza – Suma de Cuadrados tipo III	63
Tabla 15. Pruebas de Tukey HSD	64
Tabla 16. Contraste de tratamientos	65
Tabla 17. Análisis de varianza por niveles	67
Tabla 18. Descripción semanal del comportamiento de las cepas	70

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano en el Ecuador juega un papel importante en el comercio del país, representando el 2% del PIB general y el 35% del PIB agrícola. La producción de este cultivo permite la generación de empleo para un millón de familias, además de beneficiar a otros 2,5 millones de personas. La importancia bananera en el país es tal, que un aspecto clave a tomar en cuenta para el correcto desarrollo de dicha actividad agrícola es el control de plagas cuya incidencia negativa resulta en pérdidas económicas considerables (Regalado et al., 2019).

El banano no está exento de problemas fitosanitarios, entre los cuales destaca la presencia de plagas como el picudo negro, responsable de pérdidas de hasta el 42% de las cosechas siendo considerado el principal insecto plaga del banano, el cual actúa en estado larvario penetrando en el corno de la planta, lo que genera debilitamiento y pérdidas en el rendimiento de los racimos (Garófalo, 2020).

La creciente búsqueda de alternativas para el control de este tipo de plagas se ha centrado en el uso de hongos entomopatógenos. Especies como *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae*, presentes en suelos de todo el mundo y que actúan como reguladores naturales de insectos han sido estudiadas con este fin. Esta investigación tiene como finalidad, evaluar la mortalidad de cepas de *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae* en diferentes concentraciones sobre ejemplares de picudo negro.

1.1. Antecedentes

Países como Costa Rica, Colombia, Honduras, Guatemala y Ecuador son los principales comercializadores del banano. Para el Ecuador, esta actividad agrícola representa un gran capital, siendo una fuente de generación de empleo muy importante. (Pozo, 2022). Estos países

dedicados a la producción de banano tienen como factor común el desarrollo de plagas, destacando el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), que provoca un déficit en el rendimiento de las producciones en las industrias bananeras, generando pérdidas económicas (David, 2020).

El picudo negro perjudica de forma directa a los cultivos de banano al alimentarse de los tejidos internos de la planta, de forma que, la debilita provocando su muerte. Las heridas causadas por esta plaga permiten el acceso a enfermedades secundarias agravando aún más los cultivos (Moreno, 2022). La aparición de este insecto en Ecuador se remonta al año 1980, causando pérdidas significativas en la producción de banano en diversas zonas del país provocando una disminución del rendimiento de las producciones del banano en un 85% (Ortiz, 2021).

En la actualidad, se han implementado métodos biológicos para el control de plagas a causa del impacto ambiental producido por plaguicidas tóxicos. El uso de hongos entomopatógenos ha surgido como una alternativa de control debido a su mecanismo de infección y propagación, siendo un tratamiento más efectivo y ecológico. Entre las cepas de hongos más estudiadas se encuentran: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, entre otros (Faria et al., 2023).

1.2. Problema de la investigación

Cosmopolites sordidus es el insecto plaga con mayor incidencia en los cultivos de banano debido al impacto negativo que provoca en los mismos, en gran medida gracias a su resistencia ante agentes de control que contrarresten sus efectos (Lopez, 2020). En el Ecuador, se ha registrado un declive en el rendimiento de los racimos de banano de hasta un 85%, lo que resulta en graves pérdidas económicas para el país, y limitantes para los pequeños agricultores que dependen de la actividad agrícola para subsistir (David, 2020).

1.3.Pregunta de investigación

¿Cuál es la eficacia patogénica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como agentes de biocontrol para reducir la población de *Cosmopolites sordidus*?

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del picudo negro en el cultivo de banano.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la efectividad de hongos entomopatógenos en diferentes concentraciones aplicadas al picudo negro bajo condiciones controladas.
- Examinar mediante microscopía el avance de la infección producida por ambas especies micóticas a nivel morfológico, anatómico e histológico del picudo negro.

1.5.Hipótesis

1.5.1. Hipótesis alternativa

La aplicación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contribuyen al biocontrol del picudo negro en las plantaciones bananeras.

1.5.2. Hipótesis nula

La aplicación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* no contribuyen al biocontrol del picudo negro en las plantaciones bananeras.

1.6.Justificación

Los cultivos orgánicos son fundamentales para el desarrollo en la producción primaria de alimentos a nivel nacional e internacional, no obstante, estas labores agrícolas son

vulnerables frente a plagas como *Cosmopolites sordidus*, por lo tanto, el control biológico mediante hongos ha demostrado ser una alternativa de alta eficiencia para mantener dichas plantaciones, entre las que destaca, a nivel nacional la producción del banano *Musa* spp. (Suárez, 2021). El presente proyecto tiene como finalidad promover la reducción de plaguicidas químicos, implementando una alternativa eficaz y respetuosa con el agroecosistema bananero.

1.7.Delimitación

1.7.1. Delimitación académica

Los procedimientos planteados se concretaron por los autores con asesoría del tutor designado por la institución académica.

1.7.2. Delimitación espacial

La captura de los especímenes de *Cosmopolites sordidus* se llevó a cabo en la finca "San José", localizada en el recinto Galápagos, parroquia Roberto Astudillo, cantón Milagro, provincia del Guayas. La experimentación realizada en los mismos se ejecutó en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, campus María Auxiliadora, km. 19 vía a La Costa, sede Guayaquil.

1.7.3. Delimitación temporal

El tiempo provisto para la finalización del proyecto en todos sus aspectos fue de 4 meses, desde mayo de 2023 hasta agosto de 2023.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Banano (Musa paradisiaca)*

2.1.1. *Generalidades*

El banano es una fruta tropical que comprende un número variado de especies pertenecientes al género *Musa* de la familia de las Musáceas. El banano consta de dos partes: cáscara y pulpa. Esta última es la porción comestible de la misma, la cual es muy rica en nutrientes (Amini et al., 2019).

Por otra parte, la cáscara corresponde a la porción no comestible de la fruta que, por lo general, es desechada como materia orgánica a procesar. Sin embargo, estudios acerca de sus componentes han dado lugar a investigaciones sobre su posible uso como por ejemplo en la elaboración de plásticos biodegradables (García & Sánchez, 2021).

2.1.2. *Taxonomía*

Musa paradisiaca es un híbrido obtenido a partir de dos especies con genomas puros: *Musa acuminata*, *Musa balbisiana* y sus cultivos derivados (Chiriboga, 2018). En la tabla 1 se detalla la taxonomía de esta especie.

Tabla 1. Taxonomía de *Musa paradisiaca*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Musaceae
Género	<i>Musa</i>
Especie	<i>paradisiaca</i> L

Nota: Descripción de la taxonomía de la especie *M. paradisiaca*.

Fuente: (Herrera, 2021).

2.1.3. Importancia comercial

El banano se encuentra entre las frutas más cultivadas y exportadas en el mundo, con un alto rendimiento a nivel económico, como también, una continua producción en más de 100 países representando así una fuente de ingresos y de empleo muy importante en varias naciones en vías de desarrollo. La mayor producción de banano se produce en el continente americano con un 80%, seguido del Asia con el 16% y por último África con el 4% restante. Países como Ecuador, Filipinas y Costa Rica son sus máximos productores y exportadores (Chabla, 2021).

En Ecuador el cultivo del banano se ha posicionado como una de las actividades económicas que más aporta al PIB luego del petróleo y conforme crece la gran demanda de exportación de fruta, se ha convertido en una fuente empleo y alimento para la población (Magdama et al., 2020).

En el país existe un aproximado de 110 mil hectáreas destinadas al cultivo de banano con una producción de unas 600 mil toneladas de las cuales, la región costa provee la mayor parte de la producción en la provincia de Manabí con el 38% a nivel nacional (López, 2020).

2.2. Picudo negro (*Cosmopolites sordidus*)

2.2.1. Descripción

Los picudos son insectos que constituyen una de las plagas más dañinas para varios tipos de cultivo como el banano o la caña de azúcar representando una amenaza para la agricultura (Palmieri et al., 2022). Este tipo de escarabajos se presentan en distintas especies y tanto los ejemplares adultos como las larvas se alimentan de forma directa de los cultivos generando daños irreversibles. Aunque existen varias clases de picudo, como el negro o rayado, el primero es el que suele tener mayor incidencia en la destrucción de los cultivos (Villanueva, 2023).

Se caracteriza por tener un cuerpo de color negro, largo, estrecho y llano (sin pelaje) aunque cubierto de poros a nivel del dorso y abdomen. En cuanto a la cabeza respecta, esta es compacta, los ojos están ubicados a la mitad de la misma, se continua en un pico alargado y curvo dotado de una gran cantidad de poros con el cual se alimenta y produce agujeros en los pseudotallos de la planta del banano para la introducción de los huevos (Saltos & Vera, 2022).

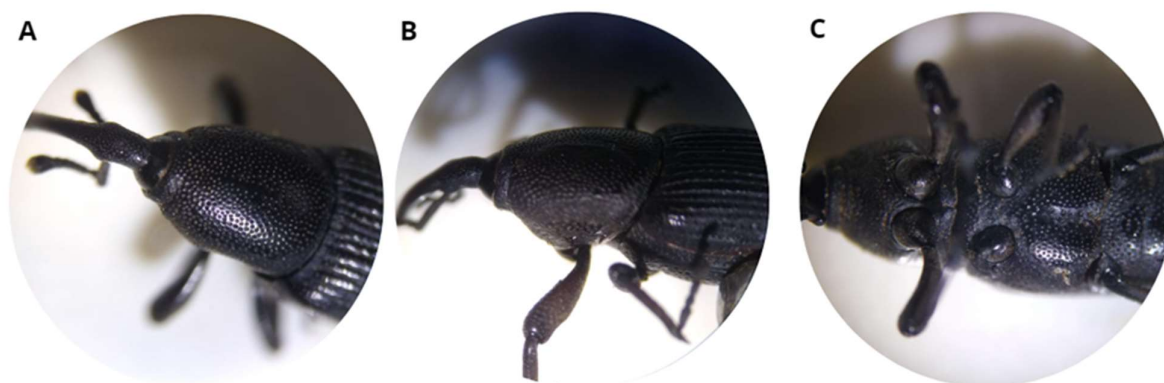


Figura 1. Características morfológicas del picudo negro; (A) Picudo negro en posición supina. (B) Picudo negro en posición decúbito lateral. (C) Picudo negro en posición decúbito prono.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

2.2.2. Distribución geográfica

El picudo negro a nivel mundial se considera como el principal insecto plaga del banano *Musa* spp. Es originario del sudeste asiático, en el país de Malasia, aunque en la actualidad se ha propagado hacia las zonas tropicales y subtropicales, regiones caracterizadas por la alta producción de esta fruta (López, 2020).

En el Ecuador, de igual manera, el picudo negro es el insecto plaga con mayor incidencia en el banano como el resto de musáceas. En general, el tratamiento o control del insecto se da

por medio de insecticidas, aunque los resultados son variables y no siempre son suficientes para combatir el problema (Bajaña, 2020).

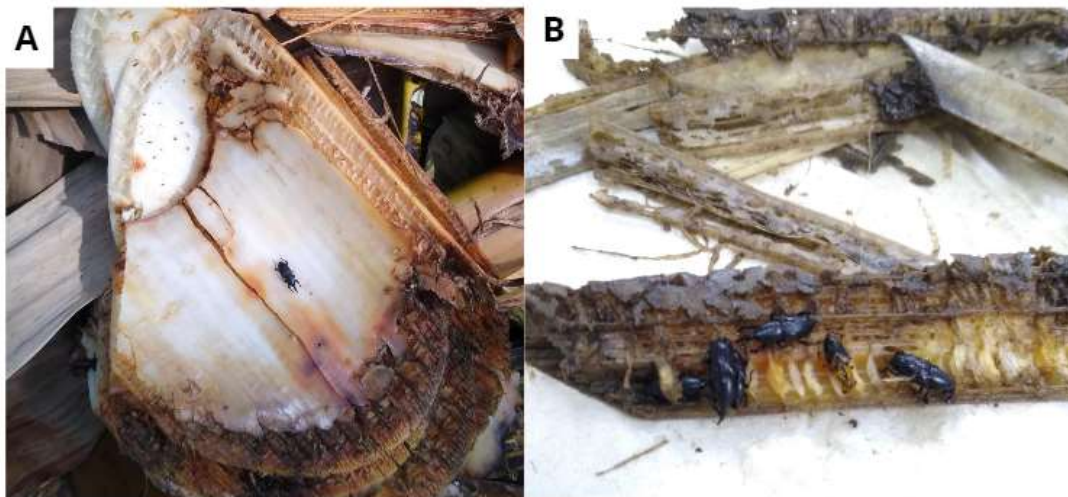


Figura 2. Picudos negros en pseudotallos de banano; (A) Picudo negro encontrado en el interior del pseudotallo de banano. (B) Picudos negros alimentándose del pseudotallo de banano.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

2.2.3. Taxonomía

En la tabla 2 se detalla la taxonomía del picudo negro.

Tabla 2. Taxonomía de la *Cosmopolites sordidus*

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Coleóptera
Superfamilia	Curculionoidea
Familia	Dryophthoridae
Subfamilia	Rhynchophorinea
Tribu	Litosomini
Género	<i>Cosmopolites</i>
Especie	<i>sordidus</i>

Nota: Descripción de la taxonomía de la *C. sordidus*.

Fuente: (Jazmín, 2021).

2.2.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida del picudo negro está definido por Torres (2021), distribuido en la tabla 3, mostrada a continuación.

Tabla 3. Ciclo de vida del picudo negro

Huevo	6-8 días
Larva	20 - 25 días
Pupa	6 - 12 días
Adulto	60 días - 2 años

Nota: Descripción del ciclo de vida de la *C. sordidus*.

Fuente: (Torres, 2021).

La hembra realiza pequeñas perforaciones en el pseudotallo de la planta del banano donde puede depositar de manera individual hasta 500 huevos (Torres, 2021).

2.2.5. Daños

El insecto puede atacar a la planta en cualquier etapa de su ciclo de vida, generando así pérdidas significativas y la limitación en el rendimiento de los cultivos en torno a la cantidad de agua y minerales disponibles para producir el fruto (Abagale et al., 2019).

El modo de actuar del picudo negro consiste en realizar perforaciones en la planta, lo que causa mayor susceptibilidad ante otras plagas y enfermedades. Además, causa efectos secundarios como limitar en la absorción de nutrientes, pudrición, enanismo (en caso de perforar las semillas), clorosis, frutos de baja calidad, entre otros (Suarez & Suarez, 2020).



Figura 3. Efecto colateral causado por el daño del picudo negro; (A & B) Presencia de clorosis en cultivos

Imagen tomada por Pólit & Echeverria (2023).

2.3. Métodos de control

2.3.1. Control químico

Consiste en el uso de productos químicos para erradicar y controlar el desarrollo de las poblaciones de insectos (Ramírez, 2020). Pueden utilizarse insecticidas de manera directa en los cultivos, o combinarse con trampas (Claudio, 2020).

2.3.2. Control biológico

Consiste en el control o eliminación del organismo que está afectando a un cultivo mediante el uso de otro organismo capaz de realizar dicha función. Estos pueden ser hongos, virus, bacterias los cuales actúan como antagonistas de la plaga causando la muerte de esta (Garófalo, 2020).

Entre los agentes de control biológico más utilizados para contener al picudo negro se encuentran los hongos entomopatógenos, *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Ronquillo, 2021).

2.3.3. *Control cultural*

Es un método de control de fácil accesibilidad y útil para la prevención del ataque de plagas como los picudos. Este tipo de control se basa en utilizar semillas sanas que no presenten heridas, que puedan servir de atrayente, y, mediante el uso de trampas alrededor de la plantación, se evita el ingreso del insecto en la misma (Maldonado & Meza, 2018).

Otra opción para el control de la aparición de plagas en el caso del banano es la eliminación de residuos de pseudotallos o cormos que sirven como hospederos y atrayentes de las mismas debido a que se ven atraídas por residuos en descomposición, así como la humedad del entorno (López, 2020).

2.4. *Trampas*

Existen múltiples tipos de trampas que funcionan como alternativa para controlar la cantidad de especies que atacan el cultivo. Algunas de estas son hechas con el propio pseudotallo de la planta, las cuales son muy eficaces para la captura de *C. sordidus* (Goyes, 2020).

2.4.1. *Trampa tipo sándwich*

Consiste en realizar un corte longitudinal aproximado de 30 cm en un pseudotallo y dividirlo de tal manera que queden dos partes iguales. Estos trozos se colocan junto a la planta donde una de las partes cortadas se posicionará por encima de la otra, procurando dejar un espacio para el ingreso de los picudos. Además, es recomendable el cubrir la trampa realizada con hojas de banano (Agurto et al., 2019).

2.4.2. *Trampa tipo V*

Consiste en realizar dos cortes opuestos de tal manera que quede una forma de letra V. El corte no se separa del pseudotallo, sino que se deja un trozo de este sosteniendo el segmento cortado con el fin de facilitar el ingreso de los picudos a la zona del corte (Lopez, 2020).

2.5. *Hongos entomopatógenos*

Son microorganismos que infectan a los insectos provocándoles la muerte. Constituyen el método más importante para el control biológico de plagas y suelen encontrarse de manera natural en el suelo o cadáveres de insectos nutriéndose de la materia orgánica (Domínguez, 2020). Se conoce un rango de 750 especies de hongos distribuidos en diez géneros siendo los más importantes: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Fusarium*, entre otros (Motta & Murcia, 2011).

El uso de este tipo de microorganismos presenta variedad de ventajas importantes, pues no son dañinos para el ser humano, tienen especificidad, son fáciles de reproducir, poseen alta tolerancia, adaptabilidad a distintos ambientes, entre otras. Mientras que, sus defectos son: su acción lenta, la necesidad de entrar en contacto con el insecto, y sensibilidad a altas temperaturas (Dávila, 2020).

2.5.1. *Modos de infección*

El proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos sobre un organismo hospedero se puede dividir en varias fases bien diferenciadas. Al inicio de la infección se presenta la adhesión de las esporas del hongo a la cutícula del huésped, esto se produce por medio de la secreción de ciertas sustancias proteicas y lipídicas, como adhesinas que interactúan con el exoesqueleto quitinoso del insecto (Gualsaqui, 2022).

En la superficie de la cutícula del insecto existen ciertos azúcares como la manosa que participan como señales para el reconocimiento de las esporas (Argüelles, 2016). Una vez finalizada la adhesión, se inicia el proceso de germinación, en el cual, los conidios comienzan a desarrollar los tubos germinativos que darán origen a las hifas (Dávila, 2020).

En ciertos casos también puede producirse una estructura denominada apresorio la cual tiene como función facilitar la fijación y penetración del hongo y el huésped. Una buena germinación dependerá de ciertas condiciones ambientales como la humedad, temperatura, y presencia de nutrientes (Pozo, 2022).

Tras la germinación, se produce la penetración de las hifas en la cutícula. Esta estructura está constituida por varias capas y representa un factor de resistencia ante la infección, sin embargo, el hongo ejerce dos procesos para sortear este obstáculo en forma de transformaciones físicas gracias a la presión que ejercen las hifas para penetrar en la cutícula y químicas por medio de la secreción de enzimas como lipasas o proteasas que colaboran en su degradación (Peñaloza, 2020).

Por último, una vez que las hifas del hongo han penetrado a través de la cutícula, el hongo inicia el proceso de multiplicación en el hemocele del insecto. El huésped posee un sistema inmune que le permite reconocer la presencia de sustancias extrañas para el organismo, sin embargo, el organismo micótico se las arregla para sortear este mecanismo por medio de transformaciones en las cuales las células del mismo pierden su pared celular para evitar su reconocimiento, así como la producción de sustancias tóxicas que producen necrosis en los tejidos (Bermeo, 2022).

Si esta etapa es superada con éxito, se produce la colonización de las hifas a los tejidos y la muerte del insecto, debido al daño físico ocasionado por las toxinas, deshidratación y agotamiento de los nutrientes (Fernandez, 2020).

2.6. *Beauveria bassiana*

2.6.1. Descripción

También denominado como musicardina blanda, es un hongo entomopatógeno reconocido por su uso como biopesticida para el control biológico de una gran cantidad de insectos considerados como plaga, tal como un agente simbiótico para las plantas (Kraševc et al., 2021).

Fue descrito por primera vez en 1835 por el italiano Agostino Bassi como el agente responsable del “mal del segno”, enfermedad infecciosa que afectaba al gusano de la seda (Peñaloza, 2020).

Su presencia ha sido reportada en todo el mundo formando parte natural de los suelos. Esta puede ser explicada debido a la alta capacidad de adaptación del hongo, como también, la tolerancia a distintos rangos de humedad y temperatura. Además, su alto potencial como microorganismo para el control biológico de plagas se debe a la amplia gama de huéspedes invertebrados, de los cuales se han reportado más de 700 especies que puede llegar a infectar (Doolotkeldieva et al., 2019).

Es efectivo en variedad de cultivos al ser aplicado en condiciones adecuadas, actúa adhiriéndose al insecto, colonizándolo por medio de sus ramificaciones y provocando su muerte mediante la liberación de diversas sustancias tóxicas como la beauvericina o serilproteasas (Bastidas, 2022).

2.6.2. Taxonomía

En la tabla 4 se detalla la taxonomía de la *Beauveria bassiana*.

Tabla 4. Taxonomía de la *B. bassiana*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Cordycipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i>

Nota: Descripción de la taxonomía de la *B. bassiana*.

Fuente: (Bermeo, 2022).

2.6.3. Morfología

Las colonias de *Beauveria bassiana* presentan un tamaño que puede variar de entre 0,6 a 2,3 cm de diámetro. Su aspecto es polvoso y algodonoso debido a la abundante cantidad de conidios que presenta. Al iniciar su desarrollo presenta un color blanco o cremoso, sin embargo, conforme el hongo madura, esta coloración puede cambiar a un tono más amarillento. Por otra parte, los conidióforos presentan conidios con formas variadas que pueden ser hialinas o globosas, las cuales se ordenan en zigzag con un tamaño que puede ir de las 2 a 3 micras de diámetro (Argüelles, 2016).

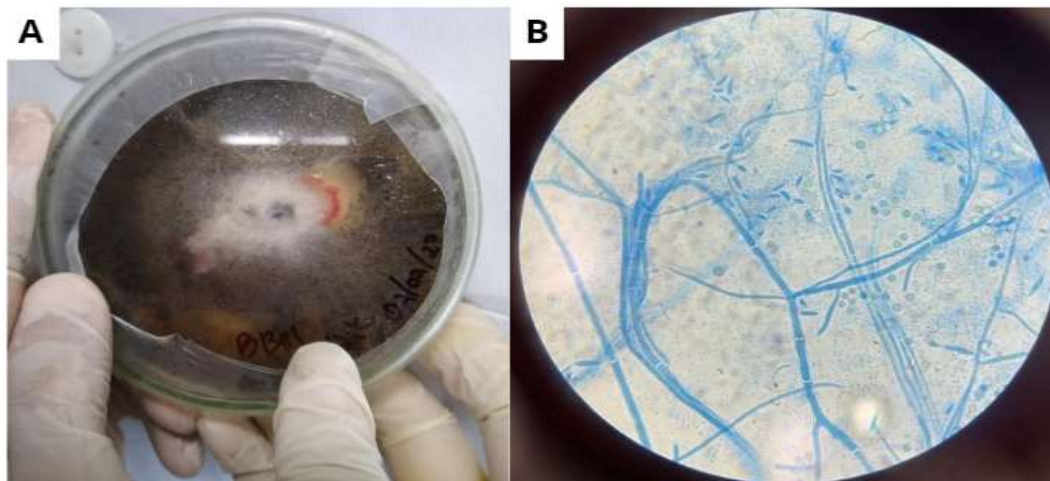


Figura 4. Visualización de la morfología de *B. bassiana*; (A) Macroscópica. (B) Microscópica.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

2.6.4. Condiciones óptimas de crecimiento

Las condiciones óptimas de crecimiento de la *B. bassiana* está detallada en la tabla 5 descrita a continuación.

Tabla 5. Condiciones óptimas de crecimiento de la *B. bassiana*

Factor	Condición
Temperatura	25-28 °C (óptima); 8-35 °C (límite)
pH	5,7-5,9
Humedad	94% (óptima); 34-100% (límite)
Nutrientes	Glucosa, sacarosa, peptona, etc.

Nota: Condiciones óptimas para el crecimiento de la *B. bassiana*.

Fuente: (Fernandez, 2022).

2.6.5. *Ciclo de vida*

Beauveria bassiana presenta un amplio rango de adaptabilidad en distintas condiciones y es capaz de vivir de manera parasitaria o saprófita, de tal manera que puede sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo sin necesidad de algún huésped (Ortiz, 2021).

La infección del hongo al huésped dependerá de la fase o estadio en que este se encuentre. En algunos casos las primeras fases como las larvas son las más susceptibles a infectarse, sin embargo, en algunos tipos de insectos la susceptibilidad ante la presencia del hongo se produce en etapas adultas. Cabe mencionar que, en el caso de las pupas, no suelen ser infectadas por parte del hongo (Gualsaqui, 2022).

2.7. *Metarhizium anisopliae*

2.7.1. *Descripción*

Es un hongo entomopatógeno aislado por primera vez en el año 1879 por el microbiólogo ruso Metschnikoff a partir la especie *Anisopliae austriaca*, un tipo de escarabajo que actúa como plaga en el cultivo de cereales. Es considerado uno de los microorganismos aplicados como controladores biológicos mejor caracterizados en el mundo, con una amplia distribución en los suelos a nivel mundial, así como también de raíces u organismos que infecta (Beys et al., 2020).

Es utilizado como bioinsecticida a causa del amplio rango de organismos a los que puede infectar, siendo capaz de atacar a más de 300 especies distribuidas en distintos órdenes de entre los cuales destacan aquellos con importancia en la industria agrícola (Sánchez & Vélez, 2021).

2.7.2. *Taxonomía*

En la tabla 6 se detalla la taxonomía del *Metarhizium anisopliae*.

Tabla 6. Taxonomía del *Metarhizium anisopliae*

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>anisopliae</i>

Nota: Descripción de la taxonomía del *M. anisopliae*.

Fuente: (Ramos, 2019).

2.7.3. Morfología

Presentan un crecimiento con micelio redondo y borde blanco. A su vez, posee conidióforos que dan lugar a conidios de coloración variable entre amarillento, verdoso o marrón (Claudio, 2020).

Los conidióforos están ramificados de manera irregular con una longitud de entre 6 a 15 micras. Los conidios tienen forma de cilindro y son unicelulares con una longitud aproximada de entre 4 a 10 micras y 2 a 4 de diámetro (Agudelo et al., 2021).

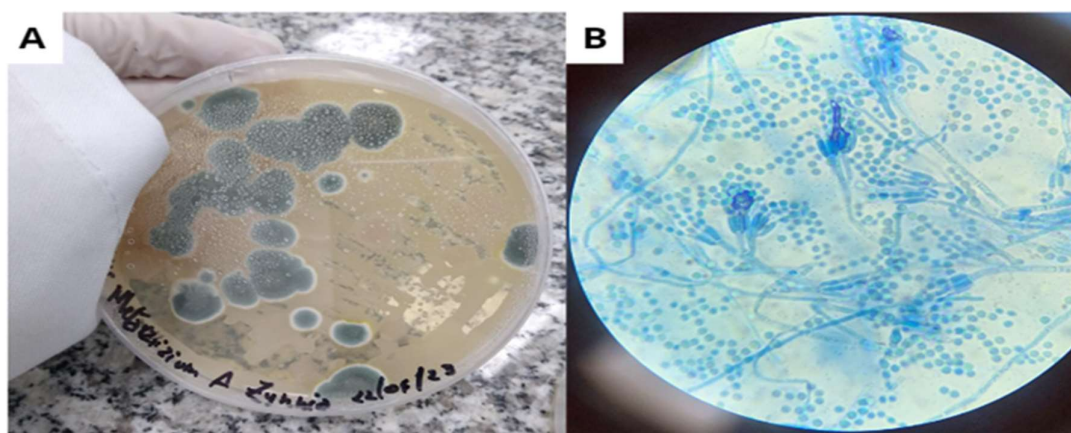


Figura 5. Visualización de la morfología de *M. anisopliae*; (A) Macroscópica. (B) Microscópica.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

2.7.4. Condiciones óptimas de crecimiento

Las condiciones óptimas de crecimiento del *M. anisopliae* se detallan en la tabla 7 descrita a continuación.

Tabla 7. Condiciones óptimas de crecimiento de la *M. anisopliae*

Factor	Condición
Temperatura	25-30 °C (óptima); 10-35 °C (límite)
pH	4-9
Humedad	100% (óptima); 85% (límite)
Nutrientes	Glucosa, sacarosa, peptona, etc.

Nota: Condiciones óptimas para el crecimiento del *M. anisopliae*.

Fuente: (Garófalo, 2020).

2.7.5. Ciclo de vida

Metarhizium anisopliae presenta naturaleza saprófita, por lo que no requiere de ningún huésped para sobrevivir. Se encuentra de forma natural en plantas, cultivos, suelo, materia orgánica, entre otras. Se desarrolla muy bien en ambientes frescos y húmedos que no tengan mucha luz solar. Se ha reportado que es capaz de atacar a más de 300 especies de insectos que, una vez muertos, son recubiertos por el micelio del hongo, el cual es de una coloración blanca en un inicio pero que, con el tiempo, se torna verdoso según el hongo esporula (Ramos, 2019).

2.8. Cortes anatómicos

Esta técnica se aplica para dividir y seccionar estructuras biológicas en una muestra facilitando la examinación y estudio de los componentes internos además de su morfología. Existen distintos tipos de cortes, entre los más comunes se encuentra el corte longitudinal, transversal, sagital y horizontal. Estos se aplican para la observación y comparación de estructuras internas del elemento analizado (Pérez & Amat, 2018).

2.9. Cortes histológicos

Los cortes histológicos permiten el estudio detallado de los tejidos. Los insectos presentan un desafío a la hora de elaborarlos debido a su estructura conformada por un exoesqueleto rígido con órganos delicados en el interior, los cuales pueden deteriorarse con facilidad sin un procedimiento adecuado. Los pasos para elaborar cortes histológicos son:

- **Fijación:** Los tejidos son sometidos a sustancias que impidan variaciones en su forma, así como de su composición celular. Ejemplos de sustancias fijadoras son la solución de carnoy o formalina tamponada al 10% (Villalobos et al., 2010).
- **Deshidratación:** Consiste en someter a la muestra a varios alcoholes sucesivos con una gradación creciente como etanol desde 70% a 100% (Arraiza et al., 2001).
- **Impregnación:** La muestra se coloca en un molde con un medio fundido como la parafina que, posteriormente, se solidificará para la realización de corte. En caso de los insectos, el tiempo del proceso variará dependiendo de qué parte del mismo se desea visualizar, esto debido a que el exoesqueleto es impermeable a la parafina, y, por ende, el tiempo de inclusión dependerá del nivel de esclerotización del tejido (Villalobos et al., 2010).
- **Corte:** La inclusión de la muestra se coloca en un micrótomo, se orienta la pieza y se ajusta el grosor del corte dependiendo del tipo de estudio a realizar. Para el caso de insectos se recomiendan grosores de entre los 5 a 20 micrómetros (Martínez, 2002).
- **Tinción:** Consiste en dotar los tejidos y células con un tipo de colorante (Villalobos et al., 2010). En caso de que la muestra previamente haya sido incluida en parafina, esta debe eliminarse colocando el portaobjetos que contenga dicha muestra en xilol, y posteriormente ser sometida a una gradación decreciente de alcoholes y agua destilada para eliminar el xilol

y proceder con la tinción. Ejemplos de tintes son hematoxilina-eosina, azul de metileno, entre otros (Arraiza et al., 2001).

2.10. *Análisis Multifactorial*

ANOVA es una técnica basada en un análisis estadístico que analiza las diferencias significativas en grupos o poblaciones con el fin de determinar dichas diferencias y relaciones entre variables mediante análisis de interacciones y factores (Goldberg & Scheiner, 2020).

Existen varios tipos de ANOVA que se aplican en función de los parámetros iniciales de cada investigación, resaltando el uso de ANOVA de uno o varios factores, medias repetidas, combinaciones entre factores y medias para estudios que requieran de pruebas Tuckey o Bonferroni para obtener resultados más confiables (Breitsohl, 2019).

2.11. *Statgrafics*

Statgrafics es un software estadístico con la capacidad de analizar datos mediante combinación de parámetros solicitados para representarlos mediante gráficas o visualizadores fáciles de comprender, este programa se aplica en la investigación científica, industria y educación optimizando recursos estadísticos y permitiendo resultados cuantitativos más precisos reduciendo la complejidad de análisis y un resultado visual comprensible (Pen, 2019).

Su variedad de funciones permite al usuario realizar análisis de prueba de hipótesis y regresión lineal, visualización de datos procesados y sin procesar, además de un control estadístico de procesos (CEP), proporcionando diseños de experimentos y automatización en sus informes de resultados, lo que optimiza el tiempo de análisis y resultados cuantitativos (Mekhrinigor, 2021).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de la investigación

En este trabajo se realizó una investigación de tipo experimental en un ambiente controlable bajo normativas de bioseguridad e ISO/IEC 17025:2005, documentando toda la información y recopilación de fuentes primarias como Google Académico, NCBI y Repositorio UPS durante los meses de mayo a septiembre del 2023.

3.2. Diseño experimental

Para el proyecto se estableció como diseño experimental el “Diseño factorial completo”, el cual se caracteriza por ser una técnica estadística aplicada para experimentos en los que existan múltiples factores y niveles donde se analizan todas las posibles combinaciones de los niveles de cada factor permitiendo una relación eficiente entre estos y el resultado esperado (López et al., 2019). En el diseño factorial completo se definieron dos factores y tres niveles por cada factor como se detalla en la tabla 8.

Tabla 8. Diseño Factorial Completo

Factor 1 _ Cepas	
T2	BB
T3	MA
T4	BB & MA
Factor 2 _ Concentración	
T2	1×10^6
T3	1×10^7
T4	1×10^8

Nota: Factores y Niveles del Diseño Factorial Completo sin replicas.

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

3.3. Ubicación

Se llevó a cabo una expedición en la finca “San José”, ubicada en el recinto Galápagos, parroquia Roberto Astudillo, cantón Milagro, en la provincia del Guayas. Se evaluó la patogenicidad producida por las cepas comerciales de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en las muestras obtenidas de *Cosmopolites sordidus*.



Figura 6. Bananera “San José”; Geolocalización de la finca (2°07'04.8"S 79°28'38.2"W). Imagen proporcionada por Google Earth (2023).

3.4. Diseño de trampas

Se prepararon 16 trampas de tipo “Sándwich” alrededor de 10 hectáreas de cultivo de banano. Cada trampa estuvo conformada por tres cortes longitudinales en los pseudotallos, de tal manera que quedaron divididos en tres partes iguales. A continuación, los trozos cortados se

colocaron cerca de los cultivos dejando espacios para permitir el ingreso de los insectos (Garófalo, 2020).



Figura 7. Preparación de trampas tipo “Sándwich” para picudo negro; (A & B) Cortes longitudinales en el pseudotallo.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.5. Recolección de las muestras

Transcurridos 10 días, las muestras fueron recolectadas en un recipiente plástico estéril con pequeñas aberturas y 25 gramos de pseudotallo fresco. Luego, se movilizaron las muestras hacia las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana, campus María Auxiliadora.

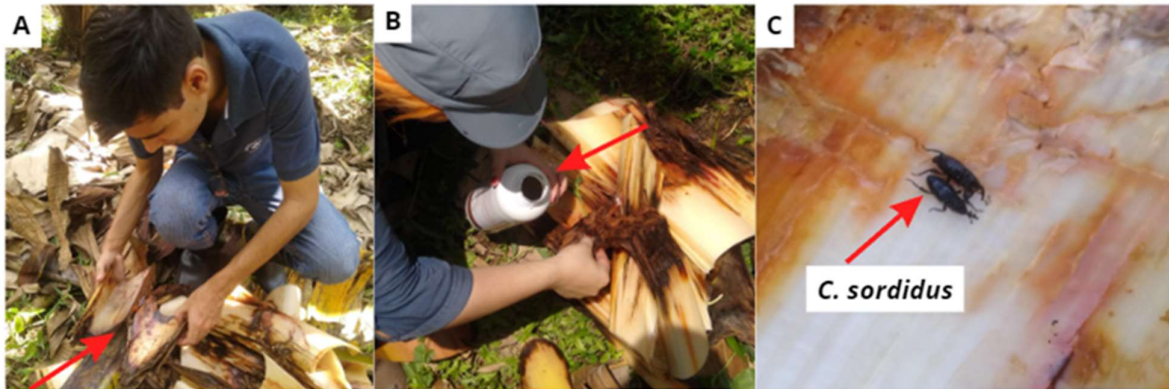


Figura 8. Recolección de especímenes de picudo negro; (A) Abertura de Pseudotallos. (B) Recolección de *C. sordidus* en recipiente estéril. (C) *C. sordidus* en el interior de la trampa.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.6. Activación de cepas y determinación de la concentración de esporas

En una cámara de flujo laminar, se colocaron 2 ml de agua peptonada en los viales de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de concentración 1×10^8 . Se agitaron de forma leve en el vórtex para homogeneizar la muestra y se esperó un tiempo de 30 minutos para la activación de las cepas. Culminado el tiempo requerido, se realizaron diluciones seriadas hasta la concentración 10^{-2} . Esto se realizó extrayendo una alícuota de 1 ml de los viales y añadiéndola en 9 ml de agua estéril contenida en un tubo de ensayo. La muestra resultante se homogeneizó en el vortex, y se repitió el proceso una vez más tomando una nueva alícuota de 1 ml de este tubo y transfiriéndola a un nuevo tubo de ensayo que, de igual manera, contenía 9 ml de agua estéril.

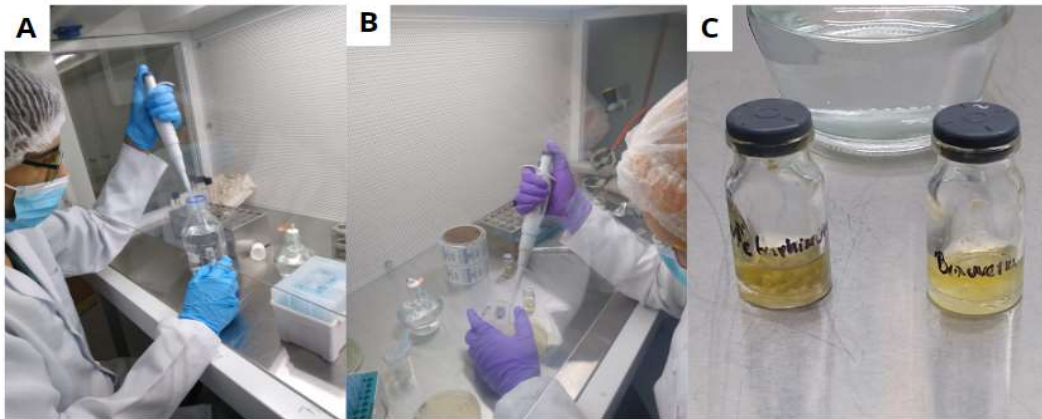


Figura 9. Activación de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*; (A & B) Activación de viales mediante agua peptonada. (C) Viales con cepa de *M. anisopliae* & *B. bassiana*.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

Por último, para comprobar que las concentraciones de esporas fueran correctas, se tomaron 10 μL de cada tubo de ensayo y se transfirieron a un hemocitómetro para realizar el conteo de esporas de manera que se obtuvieron concentraciones de 1×10^7 y 1×10^6 .



Figura 10. Conteo de esporas; (A) Observación microscópica del hemocitómetro. (B) Disoluciones seriadas. (C) Aplicación "Hemocytometer Sidekick" para determinación de concentraciones.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.7. Clasificación y esterilización

Dentro del laboratorio, se realizó la clasificación de los picudos negros en mejor estado separándolos en diferentes recipientes plásticos. Cada ejemplar se esterilizó por medio de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 30 segundos seguido de un lavado con agua destilada con tres repeticiones. Los insectos fueron devueltos a su recipiente designado al cual se le colocó 25 gramos de pseudotallo que fue desinfectado sumergiéndolo en agua en ebullición por 30 segundos (Garófalo, 2020).



Figura 11. Clasificación de muestras; (A & B) Selección de especímenes de *C. sordidus*. (C) Esterilización de las muestras.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

Tabla 9. Diseño de tratamientos del proyecto

T1 (Control) Aplicación de agua destilada en individuos de <i>C. sordidus</i> .
T2 (Cepa 1) Aplicación de <i>B. Bassiana</i> en individuos de <i>C. sordidus</i> .
T3 (Cepa 2) Aplicación de <i>M. anisopliae</i> en individuos de <i>C. sordidus</i> .
T4 (Cepa 1 y 2) Aplicación de <i>B. Bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en individuos de <i>C. sordidus</i> .

Nota: Descripción de tratamientos diseñados del proyecto.

Fuente: (Pólit & Echeverría, 2023).

3.8. Infección

La infección se llevó a cabo por medio de inmersión de los picudos negros en la solución de esporas durante 30 segundos de acuerdo con los tratamientos establecidos. Los insectos

infectados fueron devueltos a su recipiente correspondiente al que se le añadió papel absorbente empapado de con agua estéril para proveer humedad y crear un ambiente propicio para un rápido crecimiento de las cepas (Garófalo, 2020).

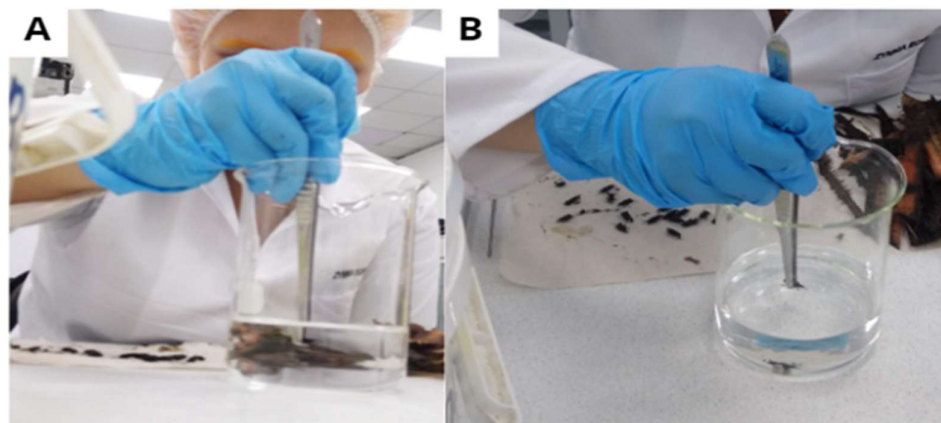


Figura 12. Infección de los especímenes de picudo negro; (A & B) Inmersión de los ejemplares en solución de esporas.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.9. Cortes anatómicos

Se tomó una muestra de los insectos que visualmente tenían un mayor índice de infección (Cepa combinada 1×10^7) y se calentó la punta de un bisturí para poder realizar una serie de incisiones a través del exoesqueleto de los especímenes.

Se efectuaron una serie de cortes longitudinales, horizontales, verticales, transversales y ventrales en la cabeza, tórax y abdomen. Esta técnica permitió visualizar mediante microscopía la anatomía, así como las estructuras internas y externas infectadas por las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Culminado este tiempo, se procedió a quitar la cutícula y a realizar incisiones con un bisturí caliente para extraer partes del abdomen.

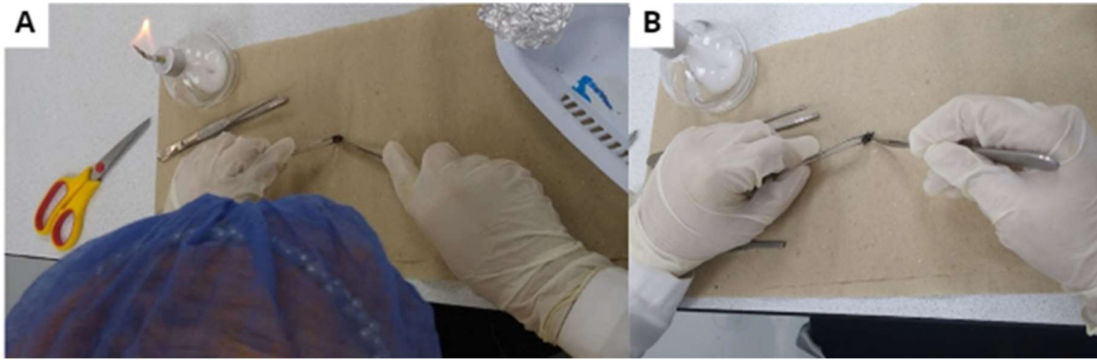


Figura 13. Cortes anatómicos; (A) Colocación de la muestra en posición adecuada. (B) Incisión en la muestra.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.10. Cortes histológicos

La preparación de las muestras para el análisis histológico de picudo negro es una modificación de la metodología de Osman et al., (2015). La fijación se realizó sumergiendo los insectos íntegros e infectados en formalina tamponada al 10% por 24h. Finalizado este período, la muestra se dejó remojando en hidróxido de potasio al 4% por 24 horas para ablandar la cutícula del insecto.

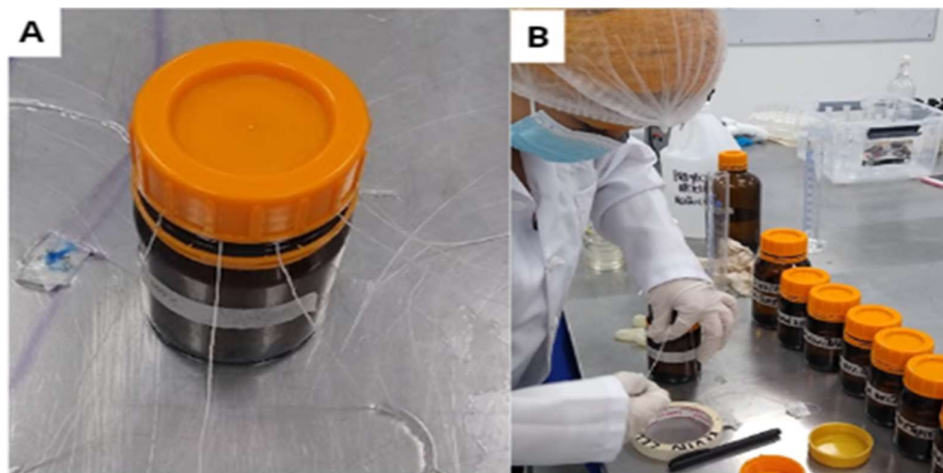


Figura 14. Fijación y ablandamiento de las muestras; (A) Muestras remojándose en formalina. (B) Muestras remojándose en hidróxido de potasio.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

Las muestras extraídas se colocaron en moldes metálicos a los cuales se les añadió parafina previamente derretida en una estufa a 75°C. A continuación, se colocó una placa sobre el molde a la cual de igual manera se le colocó parafina líquida y se dejó solidificar.

Con la parafina sólida, el molde metálico fue sometido a calor con un mechero para obtener un bloque con la muestra para realizar los cortes. Estos se realizaron con un micrótomom M-240 de la marca MYR con un grosor de 15 micrómetros.

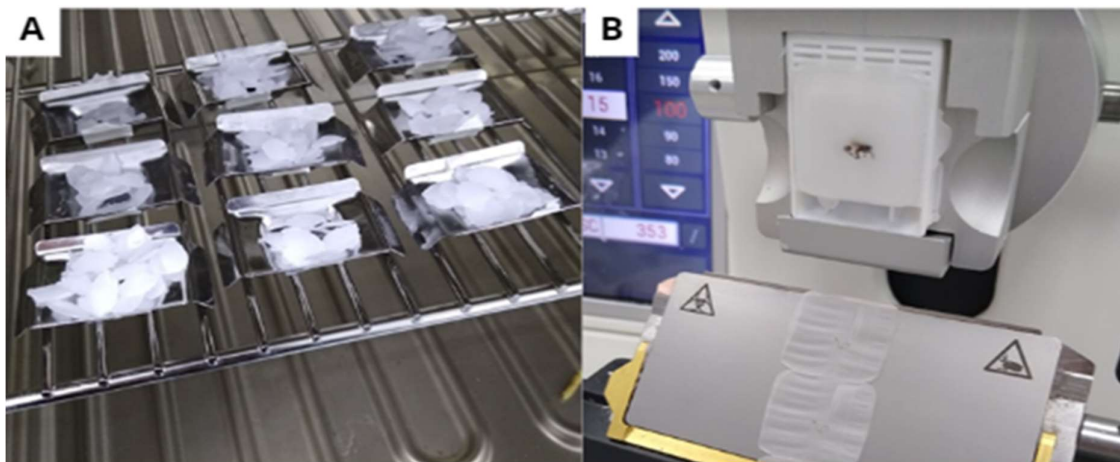


Figura 15. Preparación de moldes de parafina; (A) Muestras con parafina dentro de la estufa. (B) Micrótomom realizando cortes.

Imagen tomada por Pólit & Echeverria (2023).

Los cortes obtenidos se colocaron en agua a 45°C para estirar la parafina y se colocaron en placas portaobjetos. Estas se dejaron secar y se procedió a realizar la tinción de la cual se realizaron dos tipos: Hematoxilina-eosina y azul de lactofenol (esta última para la observación de estructuras fúngicas producto de la infección de los especímenes).

El proceso se llevó a cabo colocando las placas en cajas de tinción con diferentes soluciones por 30 segundos de la siguiente manera: Xilol al 100%, agua destilada, hematoxilina al 1%, agua potable, eosina al 1%, etanol al 70% y Xilol al 100%. Para el caso de la tinción

realizada con azul de lactofenol, esta se utilizó en reemplazo de la hematoxilina y eosina. La visualización de los cortes se realizó por medio de un microscopio marca Leica, modelo DM750 RH 4S en un objetivo de 40x.

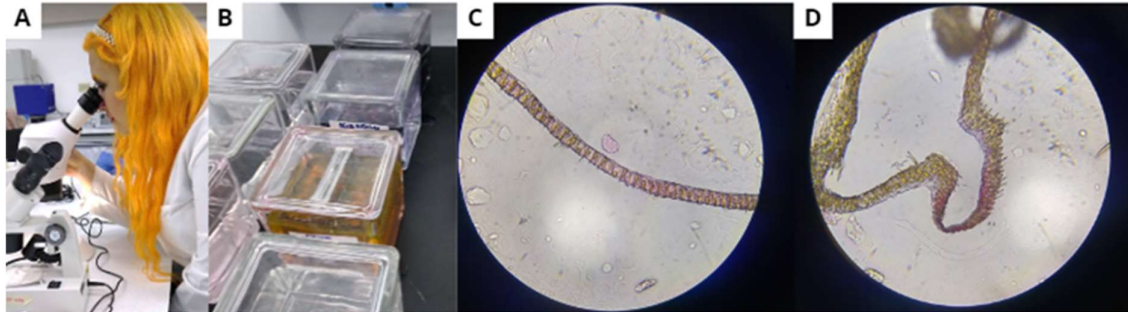


Figura 16. Preparación de los cortes histológicos (A) observación de resultados en el estereomicroscopio. (B) Reactivos para tinción de muestra. (C & D) Tejidos de *C. Sordidus*.

Imagen tomada por Pólit & Echeverria (2023).

3.11. Prueba interespecífica entre cepas

Se prepararon 75 ml de una disolución compuesta de Agar YPD, Stratch agar y agua destilada. Se extrajeron 25 ml del agar en estado líquido donde se inoculó una muestra de la cepa *B. bassiana*. Se vertió el contenido del agar en una caja Petri y se dejó reposar. Al cabo de 5 minutos, el agar se solidificó y se procedió a sembrar la cepa de *M. anisopliae*. Una vez finalizado el proceso, la caja Petri se incubó a 25°C durante 72 horas.

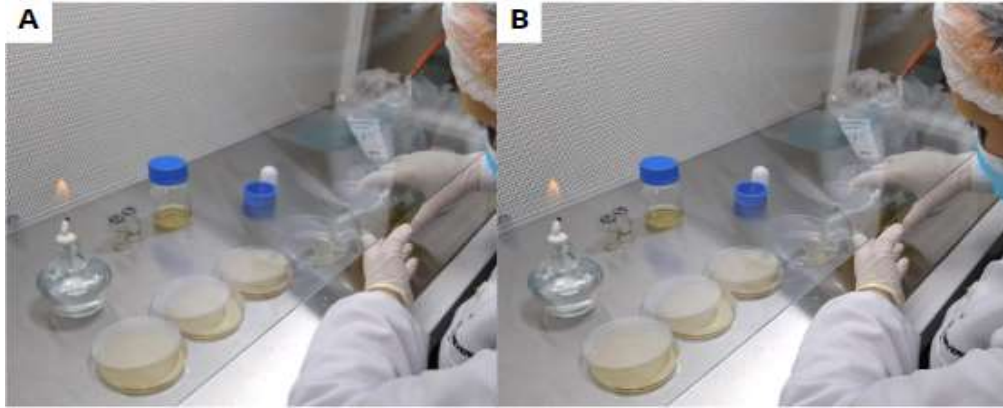


Figura 17. Prueba interespecífica entre cepas; (A) Agar inoculado con cepa *B. bassiana*. (B) Siembra de Agar con cepa de *M. anisopliae*.

Imagen tomada por Pólit & Echeverría (2023).

3.12. Análisis estadístico

3.12.1. Estadística de mortalidad en picudos negros

Para la obtención de resultados de mortalidad se aplicó la fórmula de mortalidad planteada por Garófalo (2020) bajo condiciones controladas para la cuantificación de muestras tratadas.

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

Donde:

%M (Porcentaje de mortalidad).

X (Porcentaje de muestras vivas del control).

Y (Porcentaje de muestras vivas por tratamiento).

3.12.2. Eficacia de los tratamientos bajo condiciones de laboratorio

En base a los cálculos resultantes de la fórmula de mortalidad, se aplicó la fórmula de Schneider-Orelli descrita a continuación para la obtención de eficacia en los tratamientos bajo condiciones controladas.

$$\%EC = \left(\frac{\% \text{ de mort. en muestra tratada} - \% \text{ de mort. en muestra testigo}}{100 - \% \text{ de mort. en muestra testigo}} \right) * 100$$

Donde:

%EC (Porcentaje de eficacia corregida).

% mort. en muestra tratada (Porcentaje de mortalidad en muestra tratada).

% mort. en muestra testigo (Porcentaje de mortalidad en muestra testigo).

Para trabajar con la fórmula de Schneider-Orelli es necesario de aplicar la conversión de porcentajes a arcoseno para trabajarlos en unidades adimensionales en el cálculo de eficacia de cada tratamiento.

$$\% \text{ Transformado} = \text{arcoseno} \left(\sqrt{\frac{\% \text{ de mort. del tratamiento}}{100}} \right)$$

Donde:

% Transformado (Conversión del porcentaje a unidad adimensional).

% mort. del tratamiento (Porcentaje de mortalidad del tratamiento seleccionado).

3.12.3. Análisis Multifactorial

Se usó el software estadístico Statgraphics versión 19.5.01 para la realización de gráficas de los datos obtenidos mediante el conteo acumulativo de muertes en un parámetro de 30 días.

Para la interpretación de los datos resultantes, se empleó la herramienta ANOVA multifactorial, con dos factores y tres niveles, con un valor de significancia de 0,05 para evaluar la eficacia de los tratamientos, el porcentaje de mortalidad y la concentración más eficiente.

Para este análisis no se realizaron réplicas y se aplicó la prueba de Tukey, el cual nos permitió correlacionar las medias y observar diferencias significativas entre tratamientos.

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

4.1. Resultados de la muestra control (tratamiento testigo)

La muestra control, al igual que las muestras por tratamiento, se cuantificaron de forma acumulativa durante 30 días, los datos y las gráficas demuestran el conteo total de ejemplares muertos, en varias muestras la cantidad de muertos no varió, por lo tanto, se mantuvo el mismo conteo. para este muestreo se colocaron 20 ejemplares de *C. sordidus* en 3 contenedores (total de 60 ejemplares) para cada tratamiento, en la cual se realizó un seguimiento cada 3 – 5 días para determinar la cantidad total de ejemplares muertos en la muestra testigo. Los datos recopilados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de *C. sordidus* muertos en muestra testigo

	Día 4	Día 7	Día 10	Día 14	Día 20	Día 25	Día 30
Contenedor 1	0	0	0	1	1	1	2
Contenedor 2	0	1	1	1	1	2	2
Contenedor 3	0	0	1	1	1	2	2

Nota: Conteo de muerte de ejemplares de *C. sordidus* muertos en la muestra control.

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 18, en la cual se demuestra el incremento de muertes de ejemplares de *C. sordidus* en el lapso de 30 días.

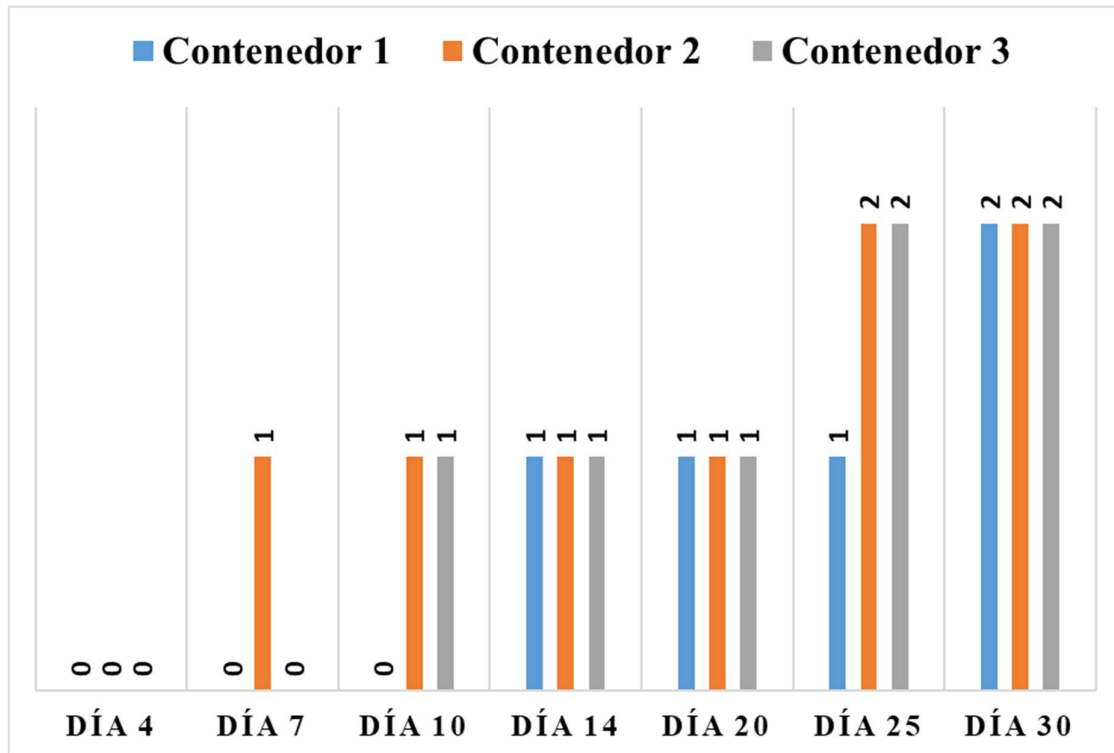


Figura 18. Cantidad de muertes en muestra control.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

En la muestra control se determinó una estadística del 90% de ejemplares vivos y un 10% de ejemplares muertos por causas medioambientales, como se detalla en la figura 19.

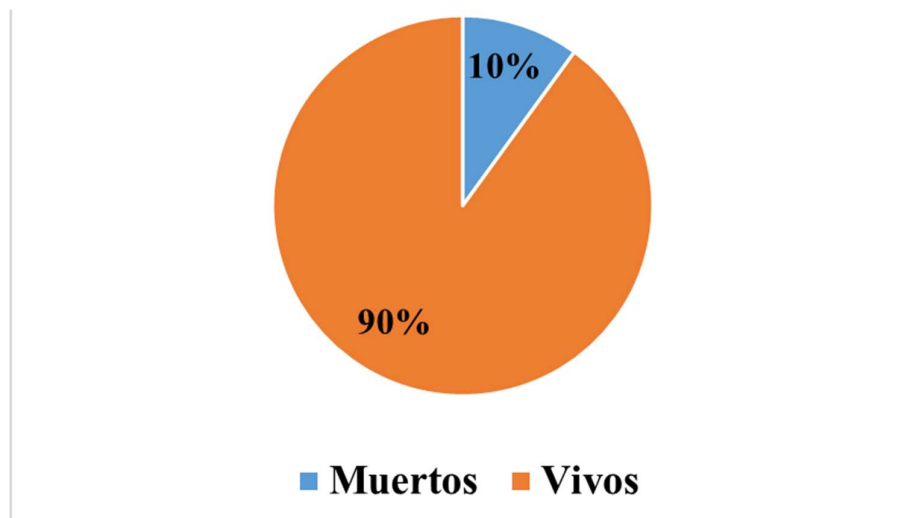


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en muestra control.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

4.2. Resultados del tratamiento 2 (*B. bassiana*)

El tratamiento 2, basado en la aplicación de la *B. bassiana* presentó las mismas características de cuantificación que la muestra control, bajo condiciones controladas se obtuvo como resultado la siguiente información (tabla 11).

Tabla 11. Cuantificación de *C. sordidus* muertos en tratamiento T2

	Día 4	Día 7	Día 10	Día 14	Día 20	Día 25	Día 30
<i>B. bassiana</i> 1×10^6	0	0	0	2	2	3	8
<i>B. bassiana</i> 1×10^7	0	0	0	0	2	2	15
<i>B. bassiana</i> 1×10^8	0	0	0	0	1	1	5

Nota: Conteo de muerte de ejemplares de *C. sordidus* muertos en el tratamiento T2.

Fuente: (Pólit & Echeverría, 2023).

Para cada contenedor se aplicó una concentración diferente, obteniendo como resultado a la concentración de la *B. bassiana* de 1×10^7 una mortalidad mayor a las demás concentraciones, en la figura 20 se observa los resultados de la cuantificación de ejemplares de *C. sordidus* durante el periodo de experimentación.

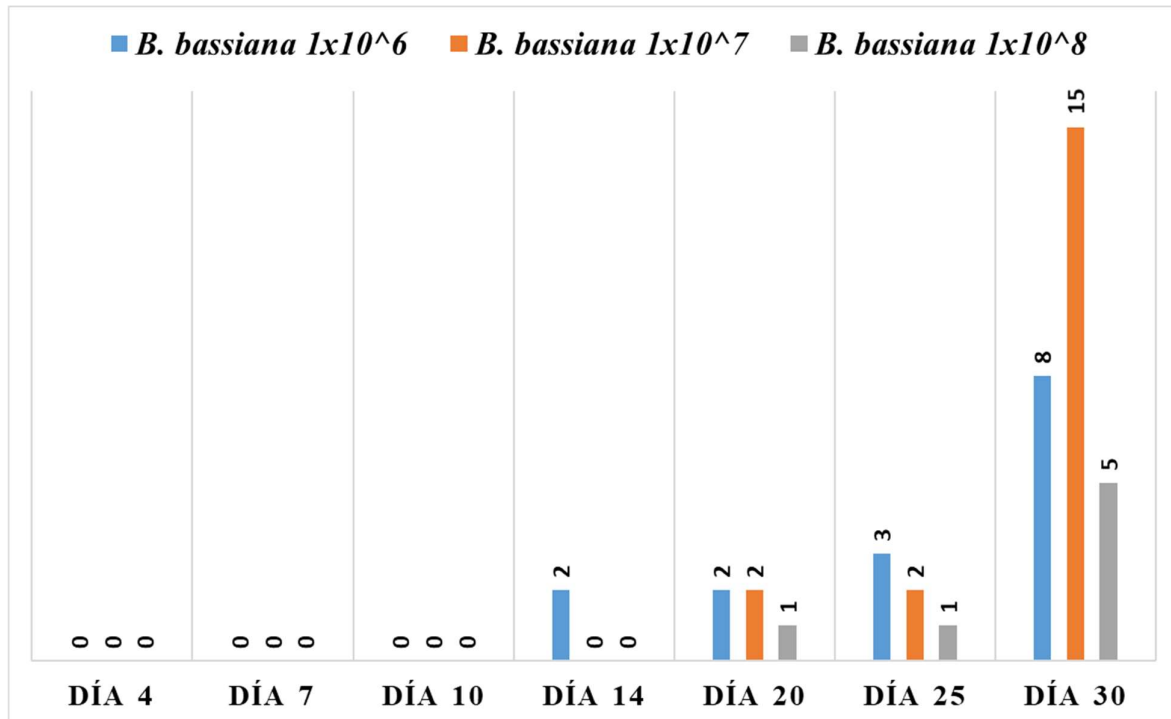


Figura 20. Mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T2.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

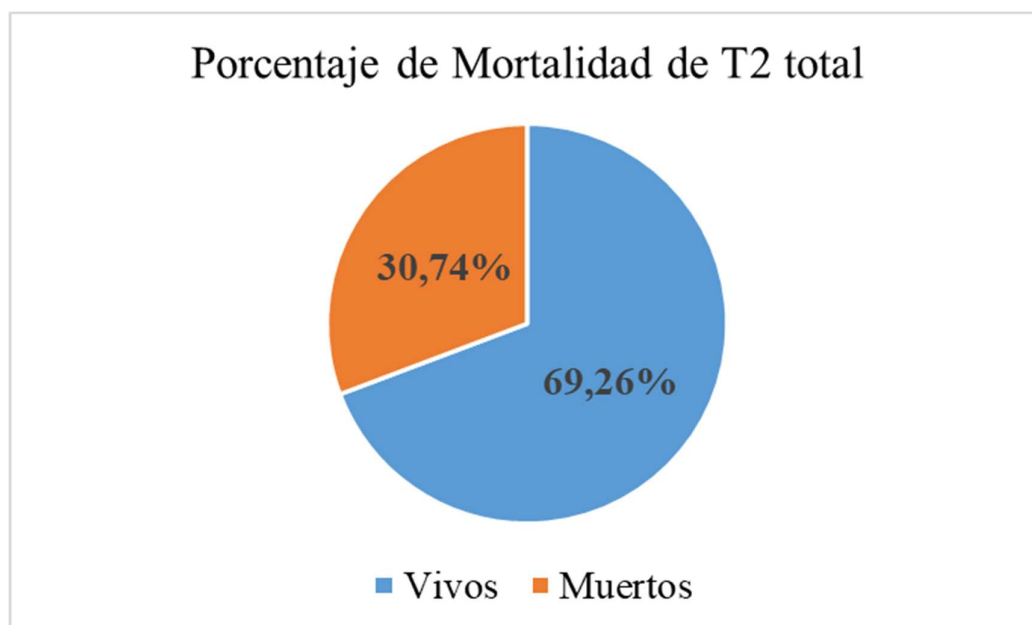


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T2.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

En base a la fórmula planteada por Garófalo (2020) se obtiene una mortalidad del 30,74%, tomando en cuenta que cada concentración se trabajó con un total de 20 ejemplares de *C. sordidus*, en la concentración 1×10^8 se presentaron 5 muertes, seguido de la concentración 1×10^6 con 8 muertes, por otro lado, la concentración 1×10^7 demostró mayor cantidad de ejemplares muertos con un total de 15 muertes.

4.3. Resultados del tratamiento 3 (*M. anisopliae*)

Para el tratamiento 3, basado en la esporulación del *M. anisopliae*, se tabuló la cuantificación de los ejemplares muertos dando como resultado la siguiente tabla.

Tabla 12. Cuantificación de *C. sordidus* muertos en tratamiento T3

	Día 4	Día 7	Día 10	Día 14	Día 20	Día 25	Día 30
<i>M. anisopliae</i> 1×10^6	1	1	1	1	2	3	3
<i>M. anisopliae</i> 1×10^7	0	0	3	4	11	12	15
<i>M. anisopliae</i> 1×10^8	0	0	0	0	1	2	5

Nota: Conteo de muerte de ejemplares de *C. sordidus* muertos en el tratamiento T3.

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

Al igual que el tratamiento T2, se aplicaron tres concentraciones distintas, las cuales fueron cuantificadas correspondiente a los demás tratamientos, estos resultados son mostrados en la figura 22.

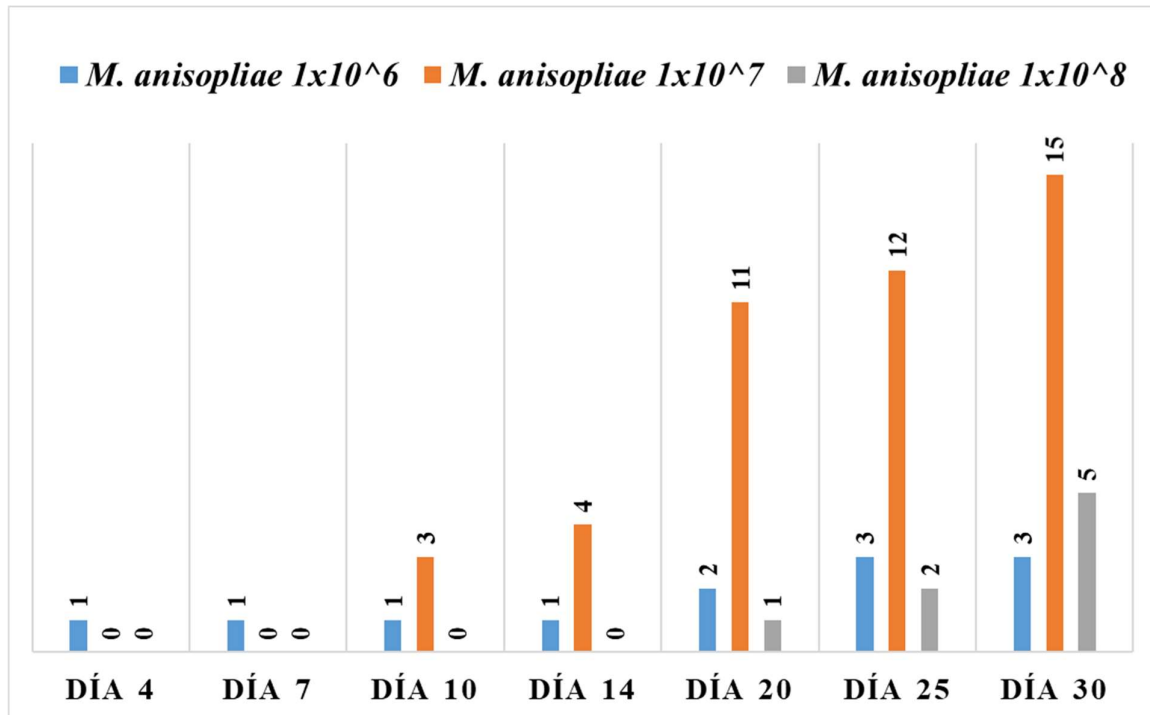


Figura 22. Mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T3.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

La mortalidad obtenida para este tratamiento fue del 21,48%. Tal como se observa en el tratamiento T2, la concentración intermedia 1×10^7 presenta un alto índice de muertes, con un total de 15 ejemplares muertos, a diferencia de la concentración 1×10^8 con 5 muertes y la concentración 1×10^6 con 3 muertes.

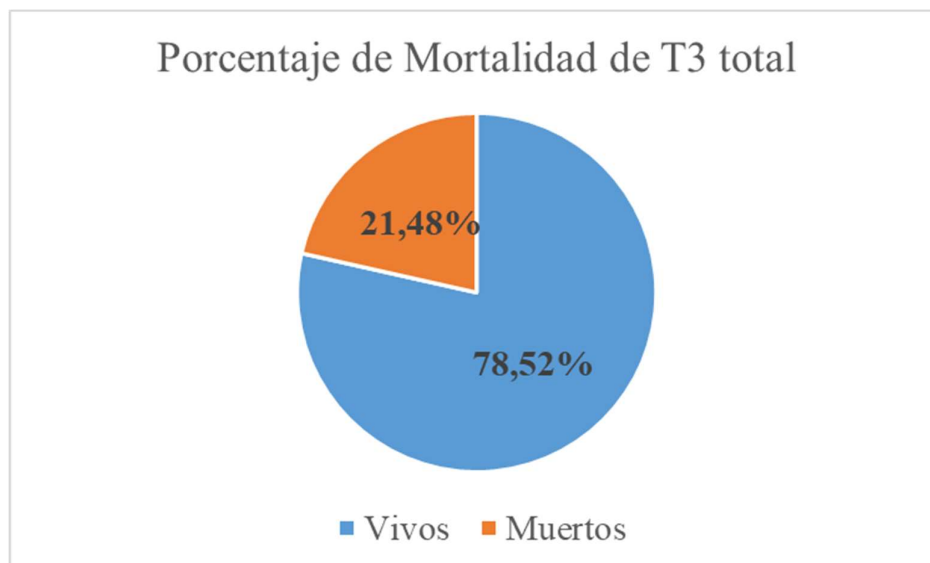


Figura 23. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T3.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

4.4. Resultados del tratamiento 4 (*B. bassiana* & *M. anisopliae*)

El tratamiento T4 se aplicó mediante una simbiosis de ambas cepas, el trabajo mutuo de dichas cepas a distintas concentraciones fue registrado de manera paralela junto a los demás tratamientos dando como resultado la cuantificación de la tabla 13.

Tabla 13. Cuantificación de *C. sordidus* muertos en tratamiento T4

	Día 4	Día 7	Día 10	Día 14	Día 20	Día 25	Día 30
<i>B. bassiana</i> & <i>M. anisopliae</i> 1×10^6	0	0	0	1	1	2	6
<i>B. bassiana</i> & <i>M. anisopliae</i> 1×10^7	1	1	1	19	19	20	20
<i>B. bassiana</i> & <i>M. anisopliae</i> 1×10^8	0	0	0	20	20	20	20

Nota: Conteo de muerte de ejemplares de *C. sordidus* muertos en el tratamiento T4.

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

La combinación de ambas cepas demostró una mayor eficacia y mortalidad de los ejemplares de *C. sordidus*, donde las concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 fueron las de mayor rendimiento con una mortalidad del 100%.

Para el caso de la concentración 1×10^6 , la mortalidad máxima fue del 30%, a diferencia de las otras concentraciones, se infiere que la concentración influye en los resultados de cada tratamiento, en la figura 24 se muestra los resultados de la cuantificación.

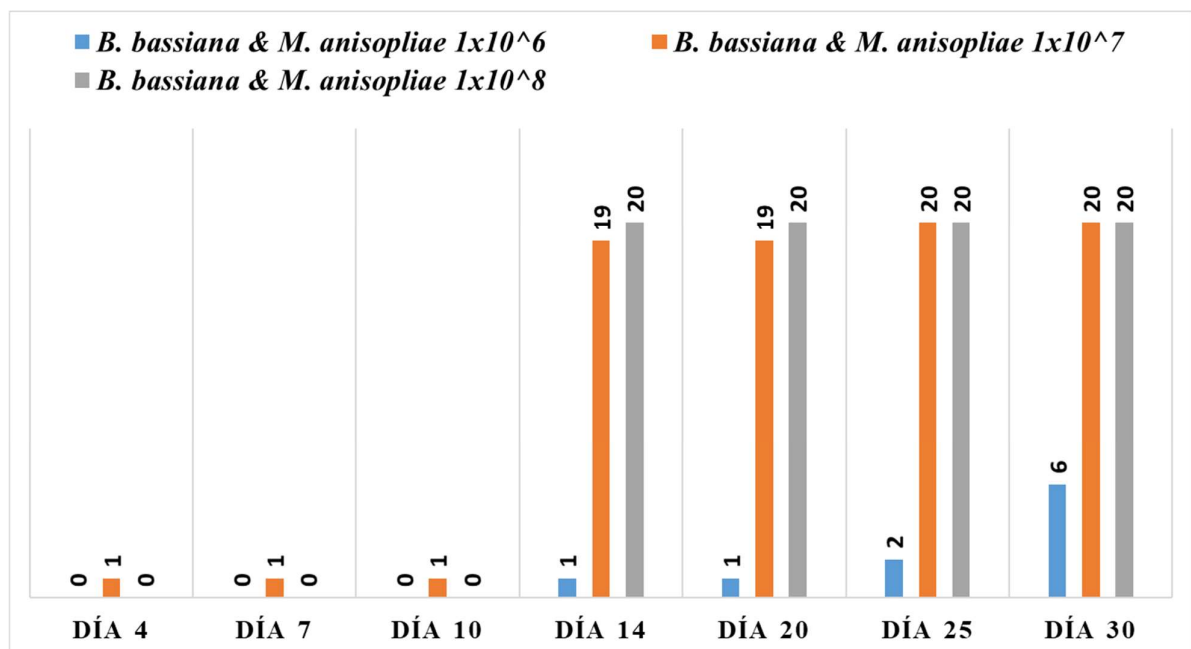


Figura 24. Mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T4.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

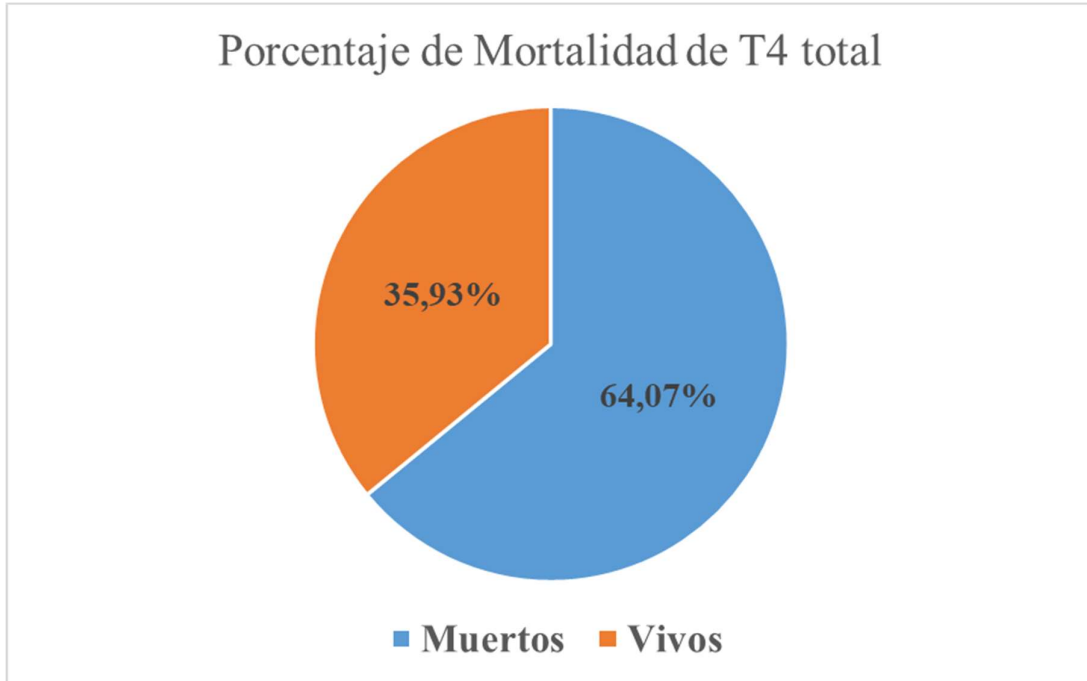


Figura 25. Porcentaje de mortalidad de ejemplares de *C. sordidus* en tratamiento T4.
Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

4.5.Eficacia de los factores (Tratamientos y Concentraciones)

La fórmula de Schneider-Orelli planteada permitió obtener porcentajes referenciales sobre la eficacia, tanto de los tratamientos T2, T3 y T4 y las concentraciones 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 . En la figura 26 se detalla los resultados obtenidos por tratamiento y en la figura 27 los resultados estimados por concentración.

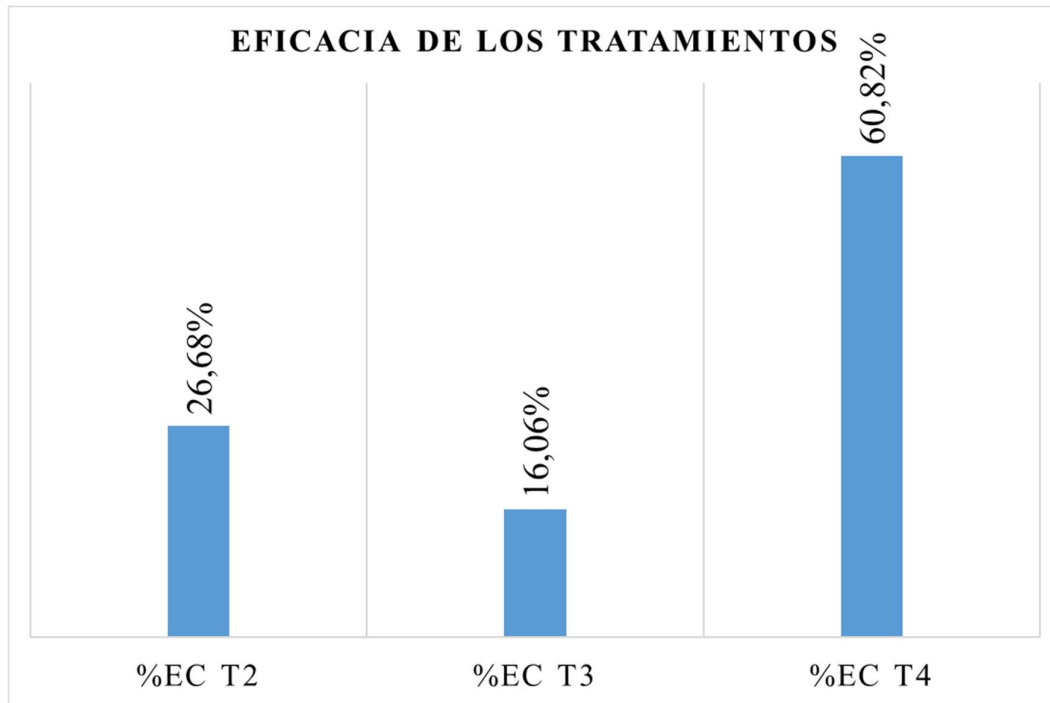


Figura 26. Eficacia de los tratamientos.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

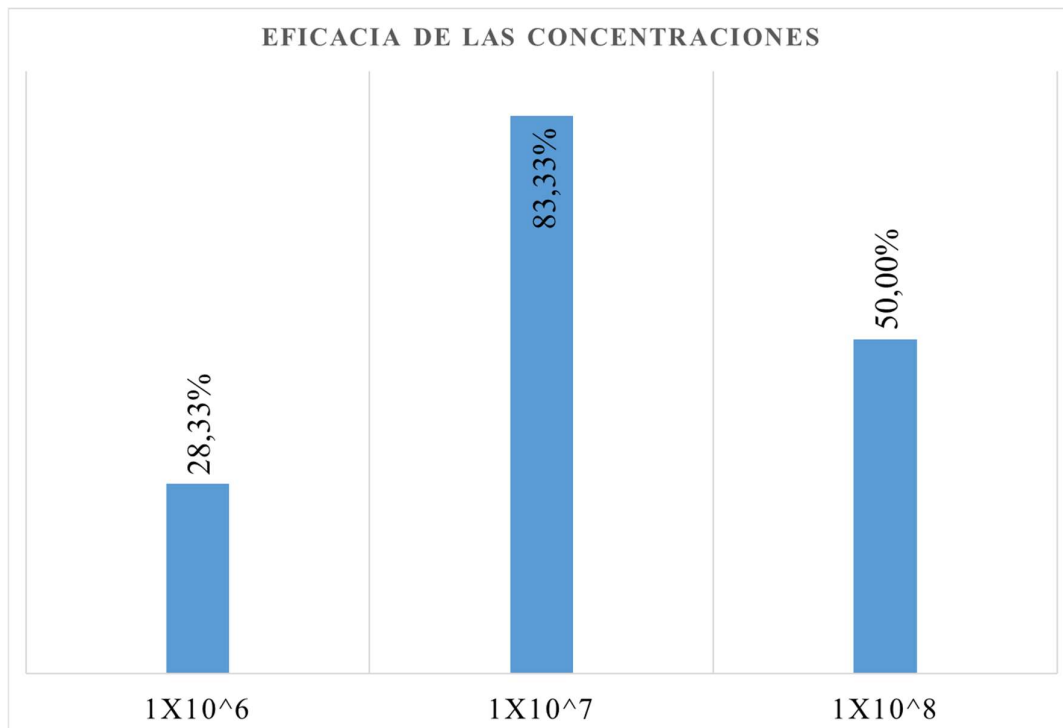


Figura 27. Eficacia de las concentraciones.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

4.6. Resultados del Análisis Multifactorial

El estudio ANOVA Multifactorial se presenta en la tabla 14 aplicando el método de Tukey HSD. Se aprecia la diferencia de medias entre las cepas para el análisis de contraste. Se realizó el análisis de varianza mediante la suma de cuadrados tipo III. Los valores de P demuestran la significancia estadística de cada uno de los factores (Tratamientos y Concentraciones), el valor de P de ambos factores y la interacción es menor a 0,05; por lo tanto, si existe un efecto significativo sobre las cepas y su patogenicidad inducida rechazándose la hipótesis nula. En el gráfico de interacciones (figura 28) se presenta las interacciones de factores del estudio ANOVA Multifactorial.

Tabla 14. Análisis de varianza – Suma de Cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Cepas	455,746	2	227,873	6,82	0,0023
B: Concentraciones	278,222	2	139,111	4,17	0,0208
Interacciones					
Ab	323,683	4	80,9206	2,42	0,0492
Residuos	1803,43	54	33,3968		
Total (corregido)	2861,08	62			

Nota: Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Fuente: (Pólit & Echeverría, 2023).

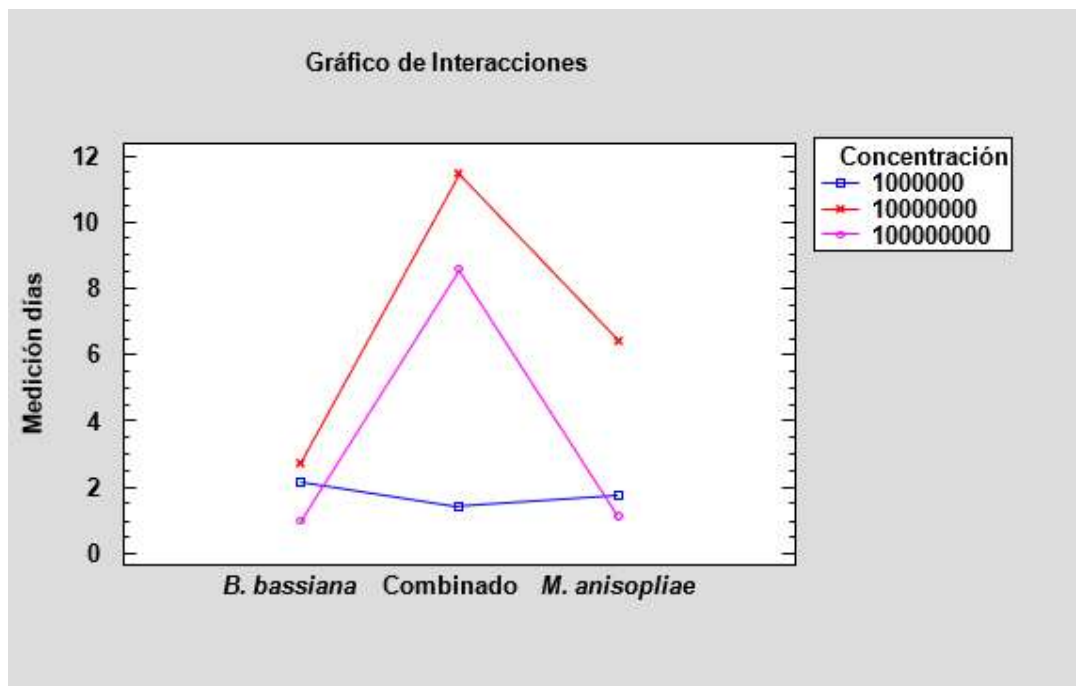


Figura 28 Gráfico de interacciones de factores.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

El estudio concluyó con dos grupos homogéneos, tabla 15, el grupo A compuesto por las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, este grupo indica que existe similitud entre ambos y el grupo B compuesto por la cepa Combinada posee diferencias significativas en relación al grupo A. Mediante la Prueba de Tukey HSD, se demuestra como la cepa combinada presenta una media mayor, a diferencia de las cepas al trabajar de forma independiente, la simbiosis de ambas cepas permitió un mayor índice de mortalidad en el tratamiento, figura 29.

Tabla 15. Pruebas de Tukey HSD

Cepas	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>B. bassiana</i>	21	3,09524	1,26108	A
<i>M. anisopliae</i>	21	1,95238	1,26108	A
Combinado	21	8,14286	1,26108	B

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

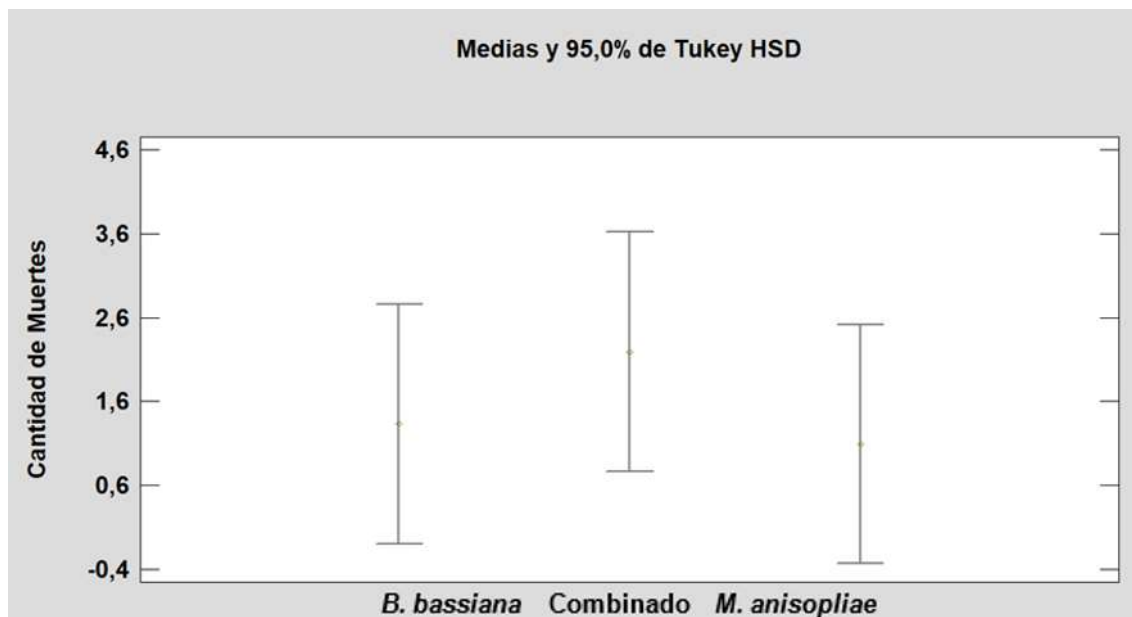


Figura 29. Gráfico de medias Tukey HSD.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

En la tabla 16 se muestra la comparación múltiple entre medias, el cual determinó la diferencia significativa que existe entre ellas. A pesar de la rápida acción de las cepas *B. bassiana* y *M. anisopliae* de forma individual, su alcance de mortalidad a largo plazo se ve limitada, a comparación del tratamiento combinado de ambos hongos, lo que permitió un resultado lento, pero con mayor eficiencia en la mortalidad de ejemplares de *C. sordidus*. En la figura 30 se observa el comportamiento de cada cepa aplicada.

Tabla 16. Contraste de tratamientos

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>B. bassiana</i> - Combinado	*	5,04762	4,29845
<i>B. bassiana</i> - <i>M. anisopliae</i>		-1,14286	4,29845
Combinado - <i>M. anisopliae</i>	*	-6,19048	4,29845

Nota: * Indica una diferencia significativa.

Fuente: (Pólit & Echeverria, 2023).

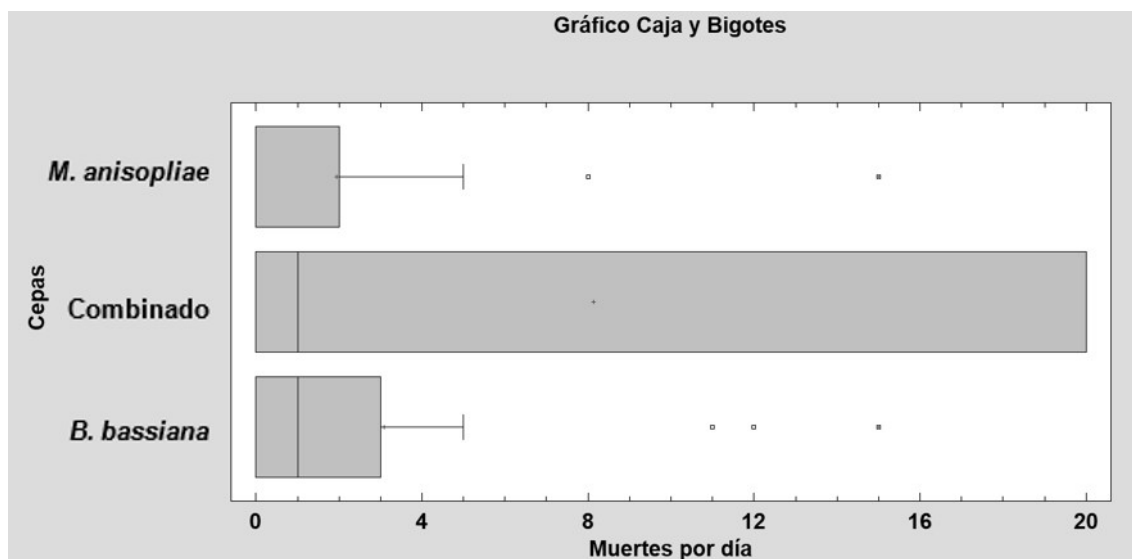


Figura 30. Gráfico de contraste de cepas

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

En la tabla 17 se muestra las diferencias de las medias y los errores estándar que existe en relación de las cepas (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) y sus concentraciones (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8). El análisis realizado permite reconocer el impacto de los factores, por un lado, el análisis por nivel en base a las cepas demuestra una mayor eficacia en la cepa combinada con una media de 8,14; la cual posee una mayor eficacia a comparación de las cepas individuales (figura 31).

Por otro lado, el análisis por nivel evaluando las concentraciones resultó en una diferencia significativa para la concentración 1×10^7 con una media de 6,90 a diferencia de las otras concentraciones (1×10^6 y 1×10^7) obteniendo la mayor eficacia en el análisis, figura 32.

Tabla 17. Análisis de varianza por niveles

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	63	4,39683			
Cepas					
<i>B. bassiana</i>	21	3,09524	1,26108	0,566918	5,62356
Combinado	21	8,14286	1,26108	5,61454	10,6712
<i>M. anisopliae</i>	21	1,95238	1,26108	-0,575939	4,4807
Concentraciones					
1000000	21	1,7619	1,26108	-0,766415	4,29022
10000000	21	6,90476	1,26108	4,37644	9,43308
100000000	21	4,52381	1,26108	1,99549	7,05213
<i>B. bassiana</i> ;1000000	7	2,14286	2,18426	-2,23632	6,52204
<i>B. bassiana</i> ;10000000	7	2,71429	2,18426	-1,66489	7,09346
<i>B. bassiana</i> ;100000000	7	1,0	2,18426	-3,37918	5,37918
Combinado;1000000	7	1,42857	2,18426	-2,95061	5,80775
Combinado;10000000	7	11,5714	2,18426	7,19225	15,9506
Combinado;100000000	7	11,4286	2,18426	7,04939	15,8078
<i>M. anisopliae</i> ;1000000	7	1,71429	2,18426	-2,66489	6,09346
<i>M. anisopliae</i> ;10000000	7	6,42857	2,18426	2,04939	10,8078
<i>M. anisopliae</i> ;100000000	7	1,14286	2,18426	-3,23632	5,52204

Fuente: (Pólit & Echeverría, 2023).

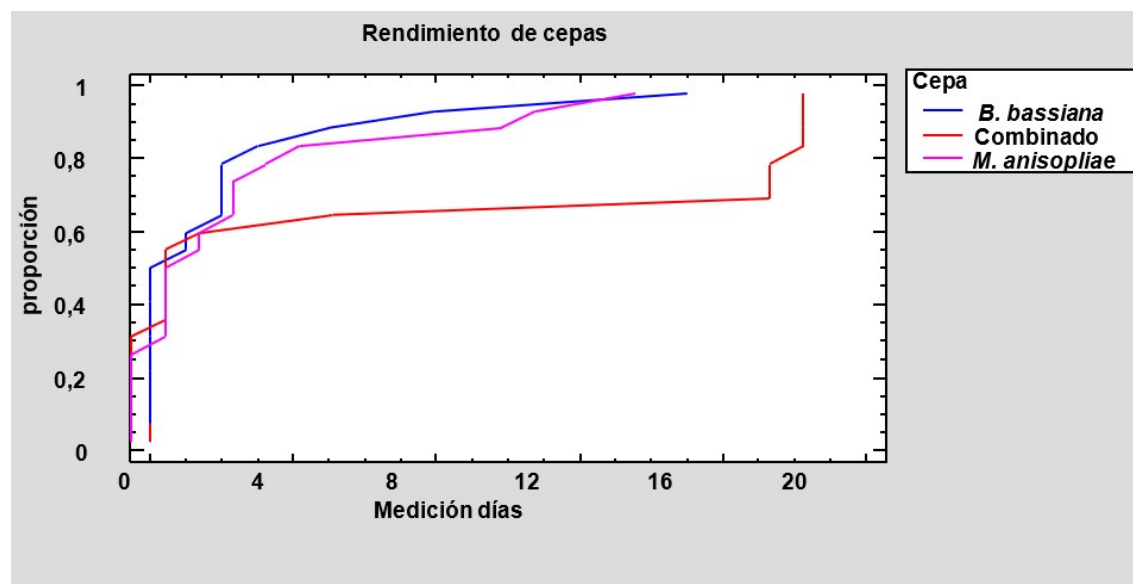


Figura 31. Gráfico de análisis del rendimiento de cepas.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

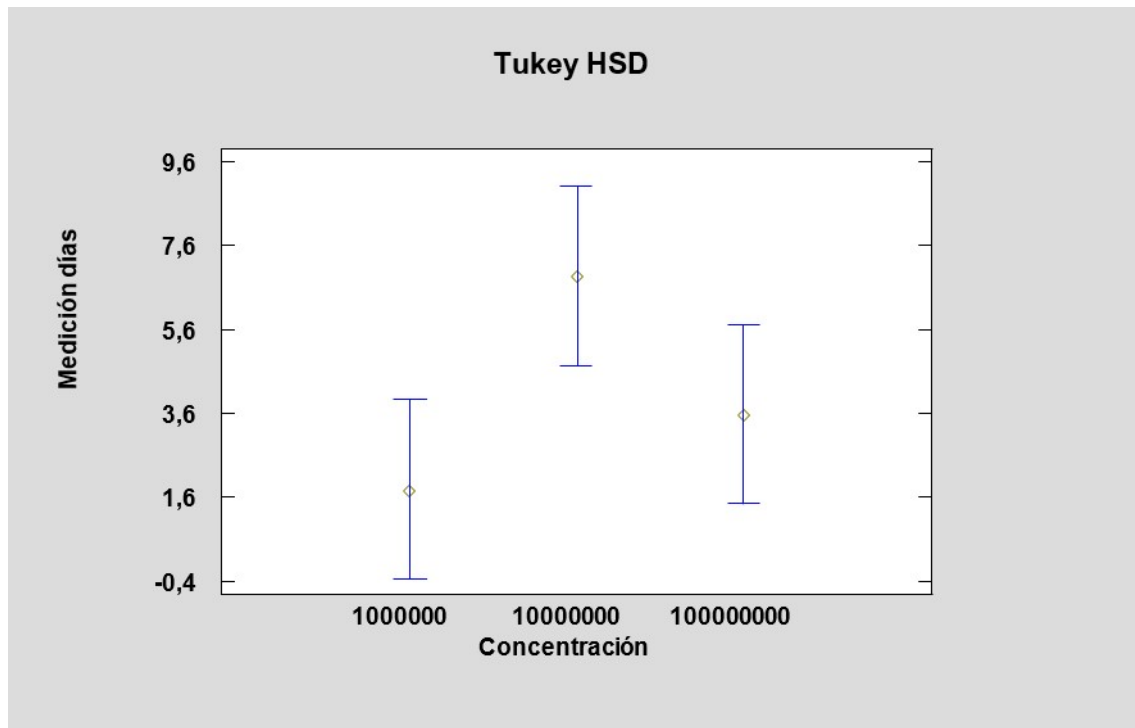


Figura 32. Gráfico de análisis por nivel para concentraciones.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

4.7. Resultados de la prueba interespecífica entre cepas

Esta prueba se realizó para observar si ambos hongos al combinarse tenían un comportamiento sinérgico o antagonista. Para esto se observó el crecimiento de ambas cepas en el agar, obteniendo como resultado un crecimiento sinérgico ya que su proliferación fue muy similar, cabe recalcar que la diferencia entre ambas cepas fue mínima. *B. bassiana* tuvo un crecimiento ligeramente mayor en comparación a la cepa *M. anisopliae*, en base a su actividad se infiere que ambas cepas al combinarse potencian su acción.

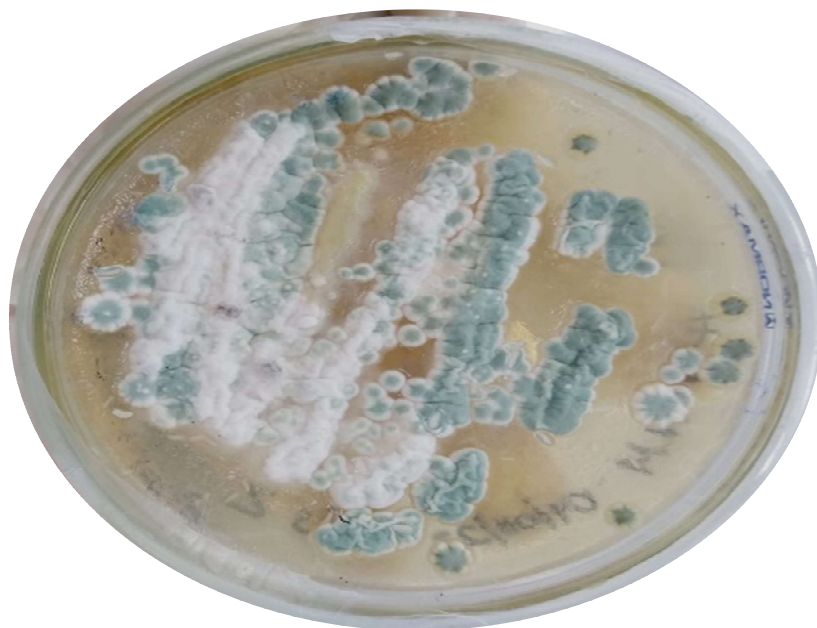


Figura 33. Crecimiento sinérgico de las cepas *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

4.8. Resultados cualitativos de los tratamientos

Los resultados obtenidos de cada tratamiento fueron observados durante 4 semanas, cada semana se encontró nuevos indicios de proliferación de las cepas comerciales seleccionadas como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 18. Descripción semanal del comportamiento de las cepas

Tiempo de Infección	Características Físicas	Comportamiento	Alimentación
1 semana	No existió cambio de coloración, ni presencia del hongo en el exoesqueleto.	Se notó una reducción en sus actividades físicas. Su movilización tornó más lenta.	Su alimentación se mantuvo constante.
2 semana	Sin cambio de coloración. Mediante el estereomicroscopio se observó presencia del hongo.	Los especímenes se agruparon de manera anormal alrededor del alimento.	Dadas las agrupaciones de insectos por fuera del tallo, la alimentación disminuyó.
3 semana	Se evidenció cambios de acuerdo a la coloración del hongo, en especial en las patas del insecto.	Inmóviles, actividad muy baja.	La alimentación se redujo de manera notable debido a la escasa actividad.
4 semana	Cambio de coloración notable. La presencia de <i>B. bassiana</i> fue abundante en zonas como el protórax y abdomen. En cambio, la infección por <i>M. anisopliae</i> , se evidenció en menor medida a nivel del pico y las patas.	Muerte de los especímenes. Aquellos con vida se mantenían inmóviles.	Cese total de la alimentación.

Fuente: (Pólit & Echeverría, 2023).

Se realizaron visualizaciones microscópicas semanales en el estereomicroscopio marca Motic, modelo Swift Line y el estereomicroscopio marca Zeiss, modelo XingPu Road SIP 215126.

En la primera semana de infección se presentaron resultados con pequeños indicios de presencia de hongos en varias partes de ejemplares de *C. sordidus*, en la siguiente figura se presentan dichas visualizaciones.

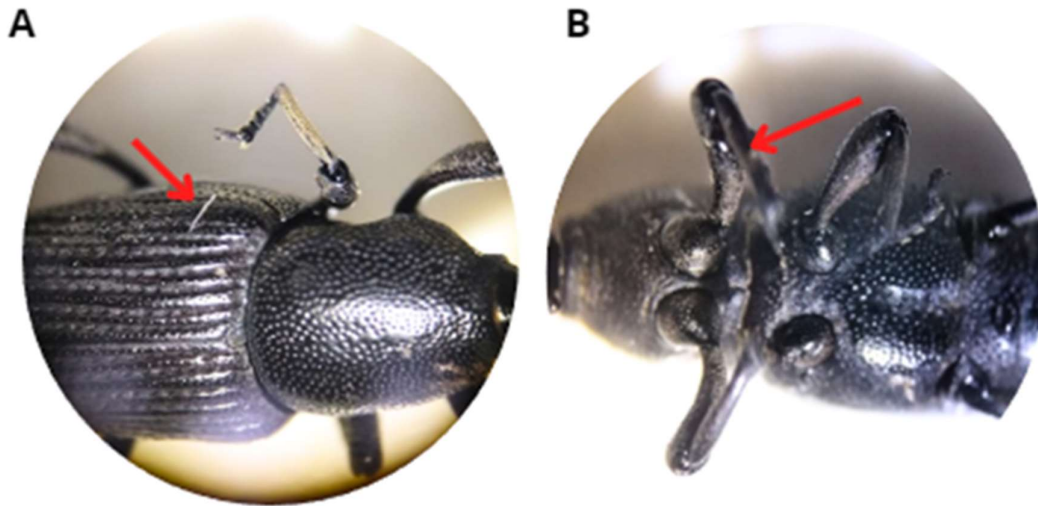


Figura 34. Picudos negros en la primera semana de infección; (A & B) Visualización microscópica del desarrollo inicial de hongos en el picudo negro.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

A nivel macroscópico se visualizó la presencia de hongos en las muestras de *C. sordidus* (figura 35).

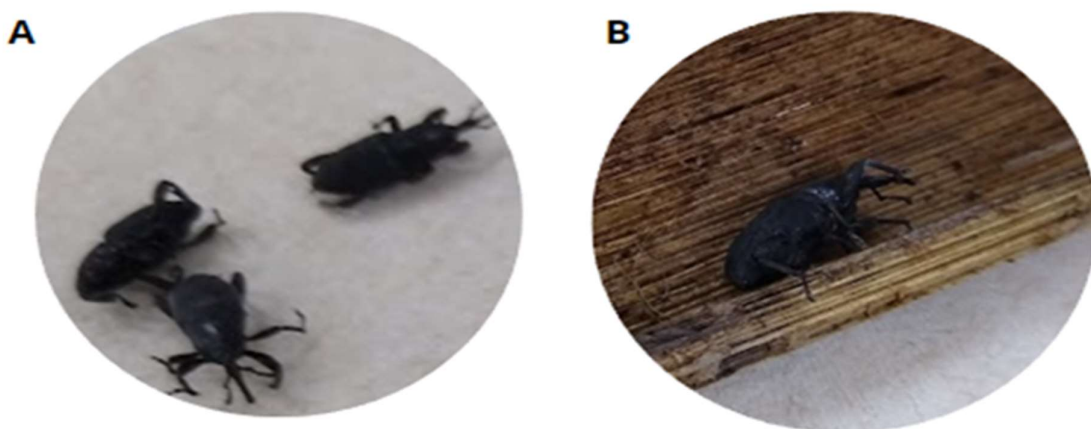


Figura 35. Picudos negros en la primera semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

En la segunda semana, mediante el estereomicroscopio se observó mayor crecimiento de hongos en los ejemplares de *C. sordidus* (figura 36).

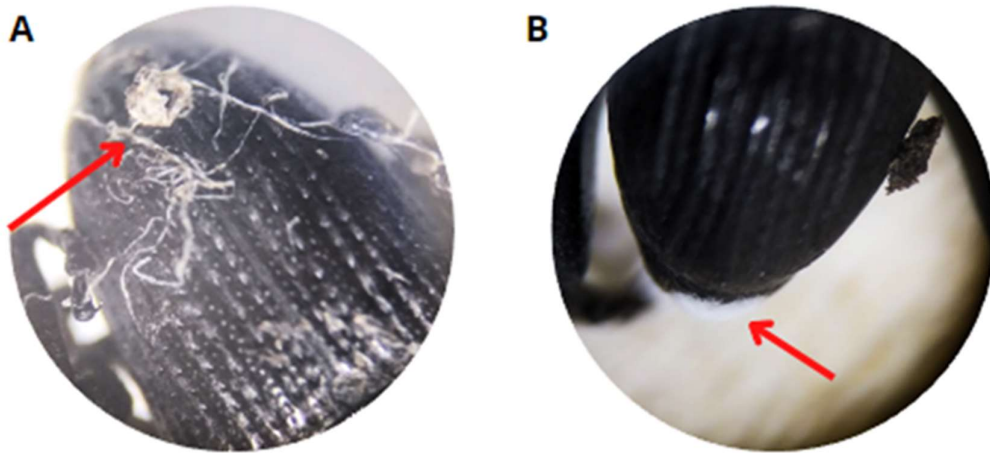


Figura 36. Picudos negros en la segunda semana de infección; (A) Visualización microscópica de hongos. (B) Presencia de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

En esta semana la proliferación del hongo *B. bassiana* fue notable como se observa en la siguiente figura.

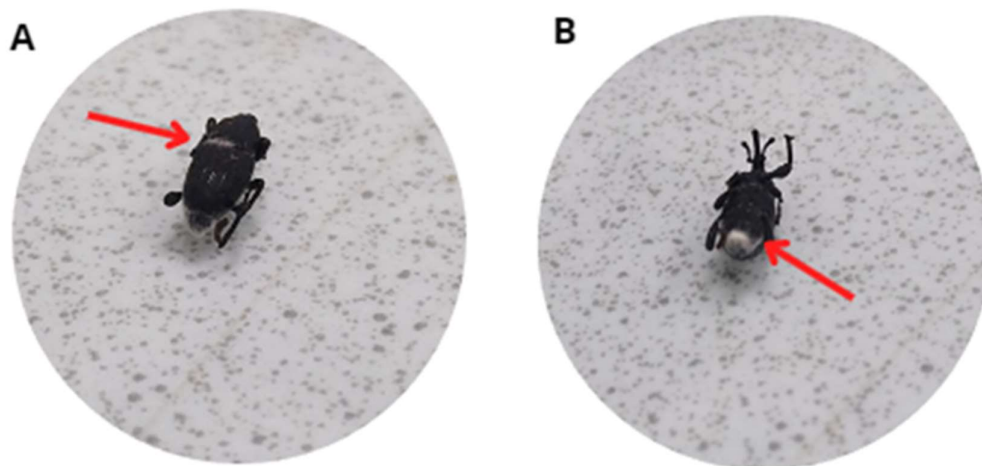


Figura 37. Picudos negros en la segunda semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

Durante la tercera semana, la cepa de *B. bassiana* había invadido gran parte del *C. sordidus*, su presencia era notable en zonas del abdomen y tórax (figura 38).

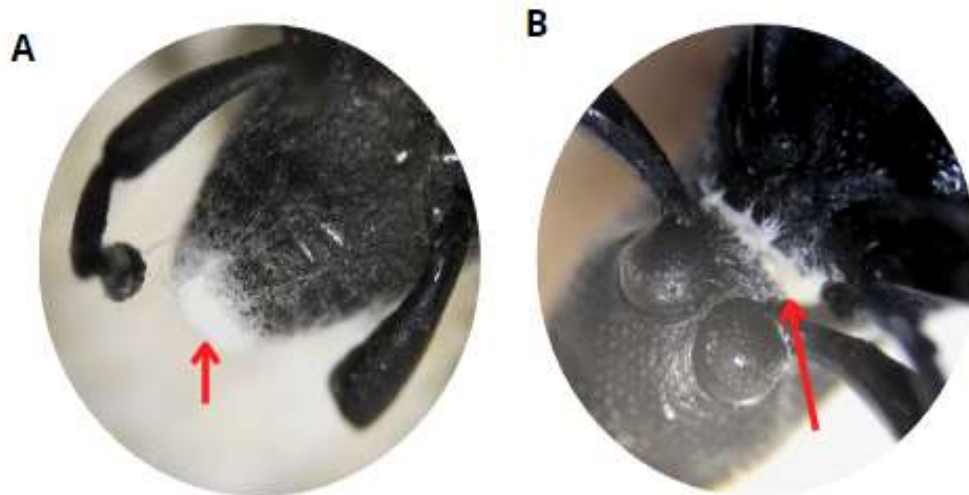


Figura 38. Picudos negros en la tercera semana de infección; (A & B) Visualización microscópica de la presencia de *B. bassiana* en muestras en la tercera semana.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

En esta semana fue más notable la proliferación del hongo, al punto de cubrir ya varias zonas del exoesqueleto.

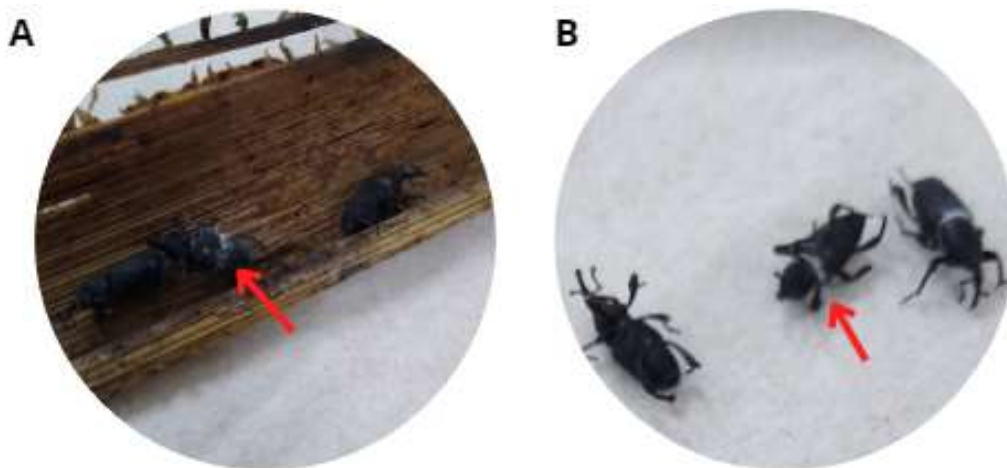


Figura 39. Picudos negros en la tercera semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

De igual manera, se realizaron visualizaciones microscópicas mediante el estereomicroscopio para registrar la proliferación de las cepas en el espécimen (fig. 40).

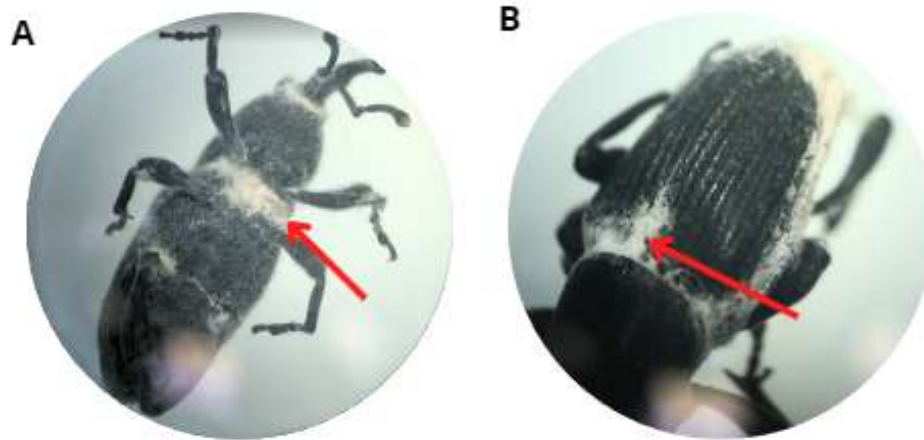


Figura 40. Picudos negros en la cuarta semana de infección; (A & B) Visualización microscópica de *C. sordidus* en la cuarta semana de infección.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Los tratamientos en la cuarta semana eran más evidentes, a nivel macroscópico, varios ejemplares de *C. sordidus* presentaron proliferación de ambas cepas, en la figura 41 se observan los resultados mencionados.

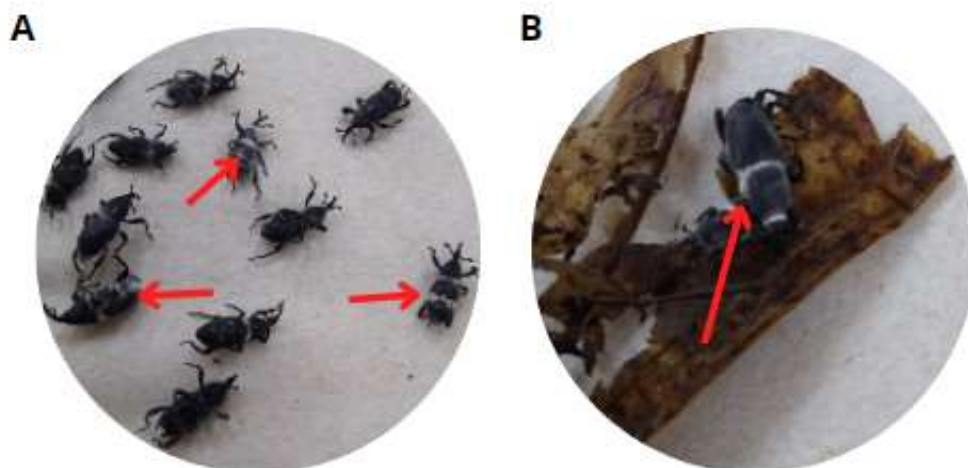


Figura 41. Picudos negros en la cuarta semana de infección; (A & B) Visualización macroscópica

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Los mejores resultados se presentaron en el tratamiento T4 a la concentración de 1×10^7 , se extrajo una muestra para su análisis en el estereomicroscopio callszeiss modelo Axio mediante el programa Labscope a un objetivo de 100x (fig. 42).

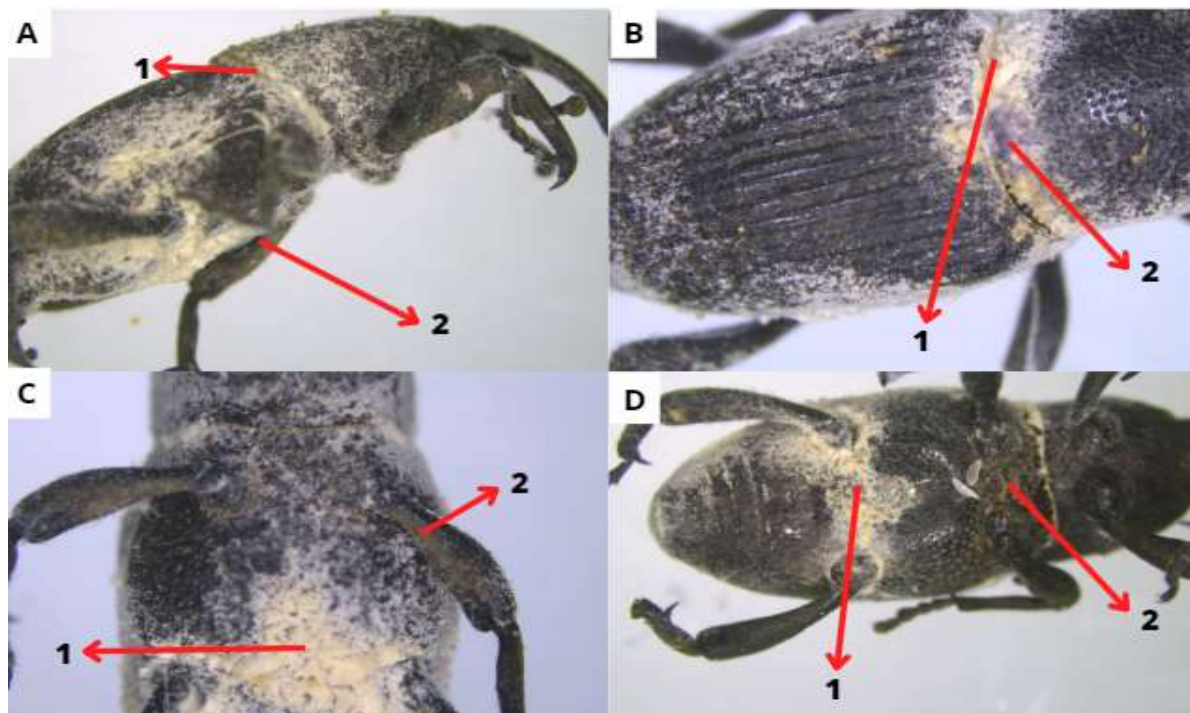


Figura 42. Vista del espécimen en estadio final de infección en el programa Labscope (A, B, C & D) Presencia de cepas (1. *B. bassiana*, 2. *M. anisopliae*).

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

4.9. Resultados de cortes anatómicos

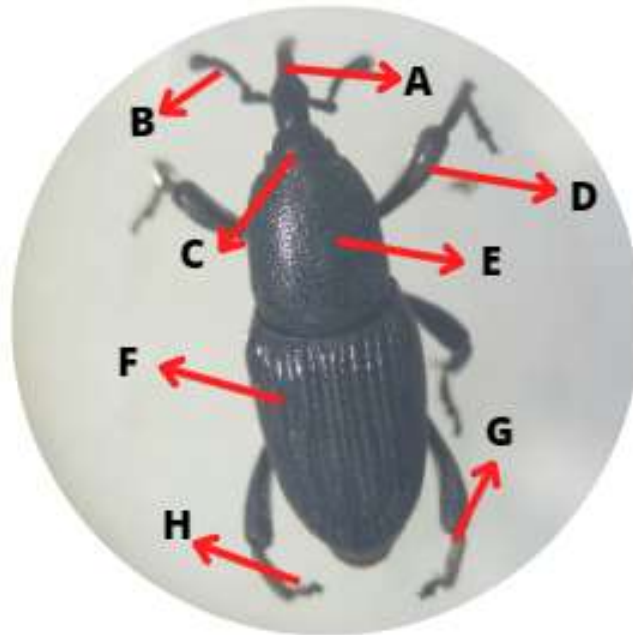


Figura 43. Anatomía del Picudo Negro Vista Frontal; (A) Pico, (B) Antena, (C) Cabeza, (D) Pata Frontal, (E) Pronoto, (F) Élitro, (G) Tibia, (H) Tarso.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

En la figura 44 se muestra la anatomía del *C. sordidus* en posición decúbito lateral.

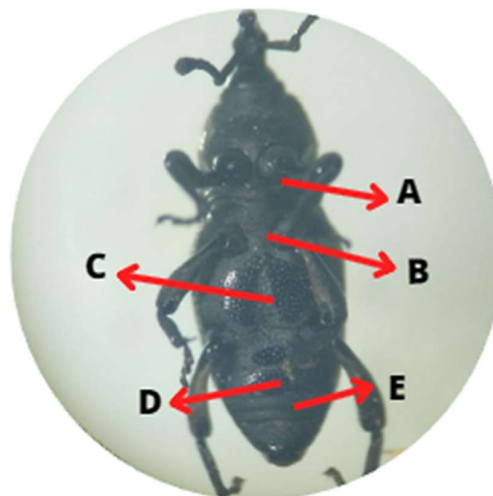


Figura 44. Anatomía del Picudo Negro Vista Posterior; (A) Esternón, (B) Mesoesternón, (C) Metaesternón, (D) Abdomen, (E) Esternitos.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Se realizó el corte horizontal separando la cabeza del resto del cuerpo (figura 45).

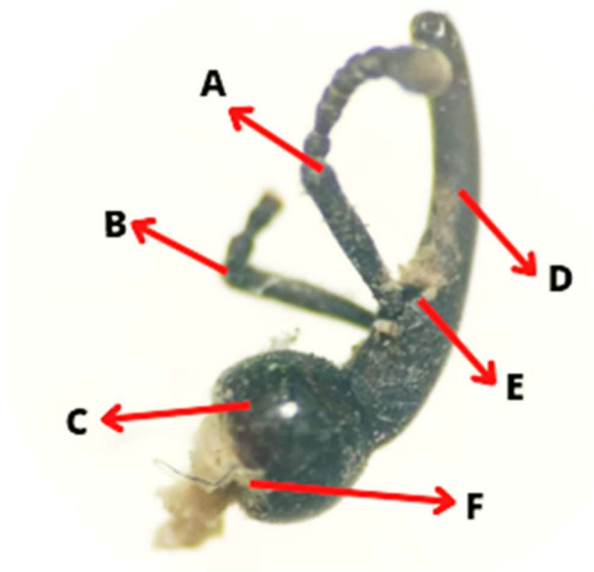


Figura 45. Cabeza del Picudo Negro; (A&B) Antenas, (C) Cabeza, (D) Pico, (E) Cepa de *M. anisopliae*, (F) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Una vez cortada la cabeza, se apreció las estructuras y colores del tórax, abdomen y alas (figura 46).

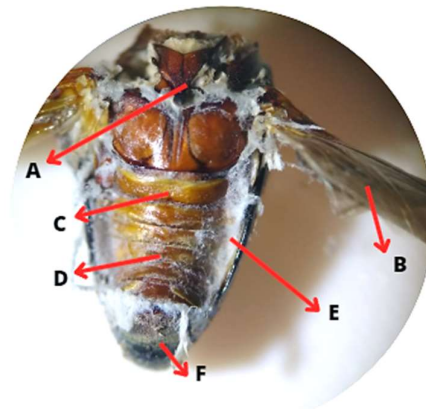


Figura 46. Tórax y Abdomen del Picudo Negro; (A)Protórax, (B)Ala membranosa, (C)Abdomen, (D) Segmentos Abdominales, (E) Cepa de *B. bassiana*, (F) Cepa de *M. anisopliae*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Se realizó un corte longitudinal en el protórax colonizado por la cepa de *B. bassiana* (figura 47).

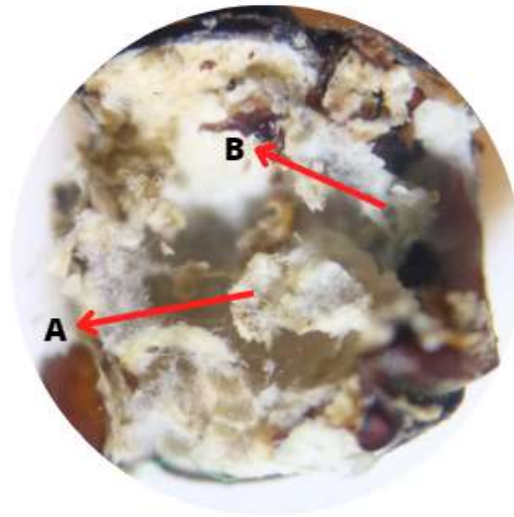


Figura 47. Abertura del Tórax del picudo negro; (A&B) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Luego de que se separó el tórax se realizó un corte sagital teniendo una sección (figura 48).

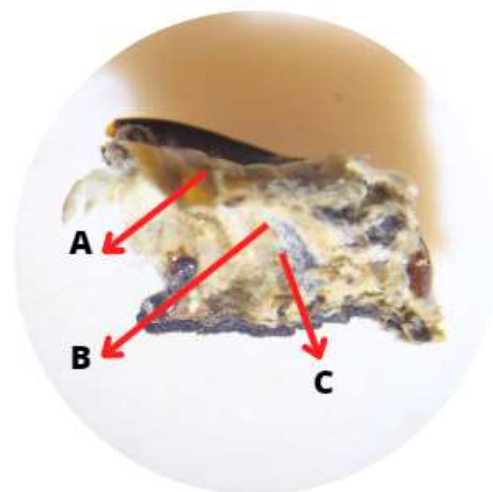


Figura 48. Abertura del Abdomen del picudo negro; (A) Abdomen, (B) Segmentos abdominales, (C) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Luego de realizar el corte en el tórax del abdomen en la parte baja se realizó un corte transversal entre los segmentos abdominales para extraer la placa subgenital (figura 49).

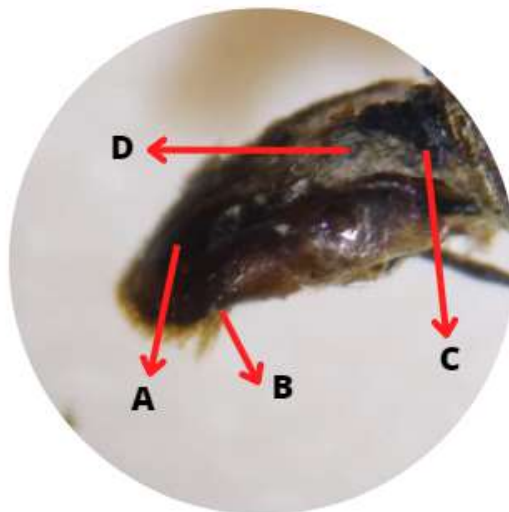


Figura 49. Órgano Copulador del Picudo Negro (A) Placa Subgenital, (B) Macrosetas, (C) Valva, (D) Cepa de *M. anisopliae*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Se separó la cabeza del tórax, extrayendo un pedazo de cutícula para observar las estructuras debajo de la misma (figura 50).

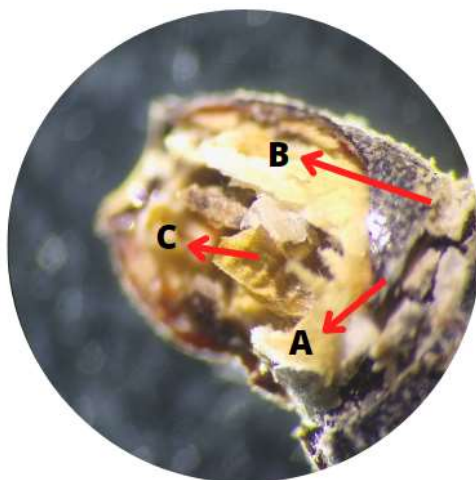


Figura 50. Abertura Frontal del Tórax (A) Tórax, (B) Cepa de *B. bassiana*, (C) Margen carinado.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Mediante un corte longitudinal se observó varias estructuras membranosas en la parte del tórax (figura 51).

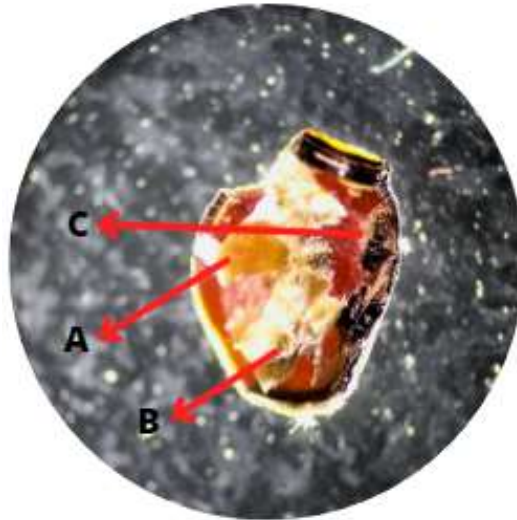


Figura 51. Visualización posterior de la abertura del tórax; (A) Margen carinado, (B) Pleura, (C) Estructuras membranosas del tórax.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Se reconoce parte del élitro junto a esporas de la cepa *B. bassiana* en la siguiente figura.

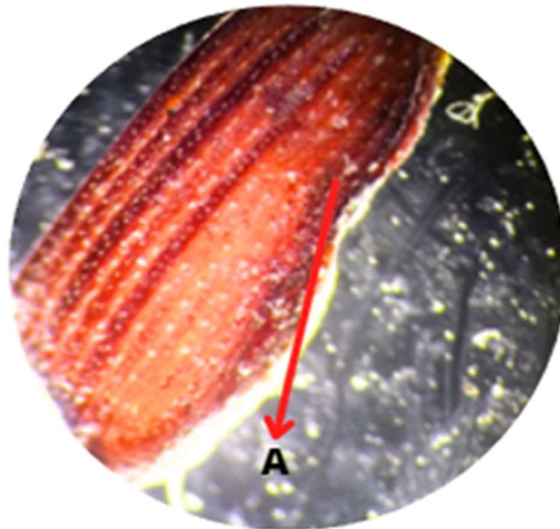


Figura 52. Élitro; (A) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

Al realizar cortes longitudinales y sagitales en el mesotórax y abdomen se encontró cepa de *B. bassiana* como se observa en la siguiente figura.

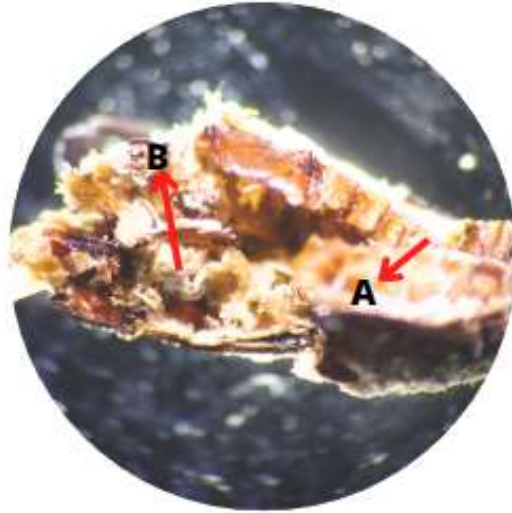


Figura 53. Visualización lateral de apertura del abdomen; Mesotórax y Abdomen, (A) Segmentos Abdominales, (B) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

La realización de un corte sagital a nivel del ápice elitral permitió reconocer la presencia de *B. bassiana* en el ejemplar de *C. sordidus* (figura 54).



Figura 54. Ápice elitral, (A) Cepa de *B. bassiana*.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

4.10. Resultados obtenidos de los cortes histológicos

Se realizó un aproximado de 150 cortes, de tal modo que se preparó 20 montajes permanentes, de los cuales se escogió 5 láminas, que presentaban mejor calidad visual. En el microscopio marca Leica, modelo DM750 RH 4S se observó un plano general a un objetivo de 40x.

Se observaron las placas en un microscopio marca Coolszeiss, modelo Axio, visualizando detalladamente algunas estructuras a un objetivo de 100x, capturando una serie de fotografías procesadas con el programa Labscope en donde se evidenció la presencia de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

En las pruebas se demostró que el uso de KOH, permitió la obtención de mejores resultados. Asimismo, se infirió que decreció los desafíos e inconvenientes presentados al momento de parafinar las muestras a causa de la impermeabilidad y volumen del integumento, también mejoró la calidad de montajes y cortes realizados de manera horizontal y vertical.

Integumento

La composición del integumento de los insectos presenta dos partes: cutícula y epidermis. La epidermis es una capa que está compuesta en mayor porcentaje de quitina y la cutícula es producida por la epidermis acompañando la distribución en las lamelas, de acuerdo con el modelo parabólico (Villalobos, 2010).

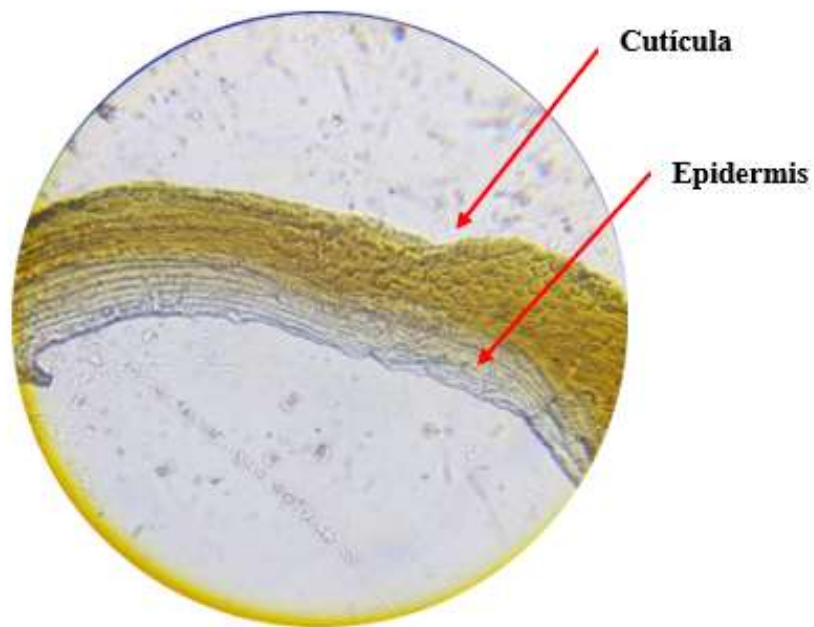


Figura 55. Visualización de integumento en un objetivo de 40X.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

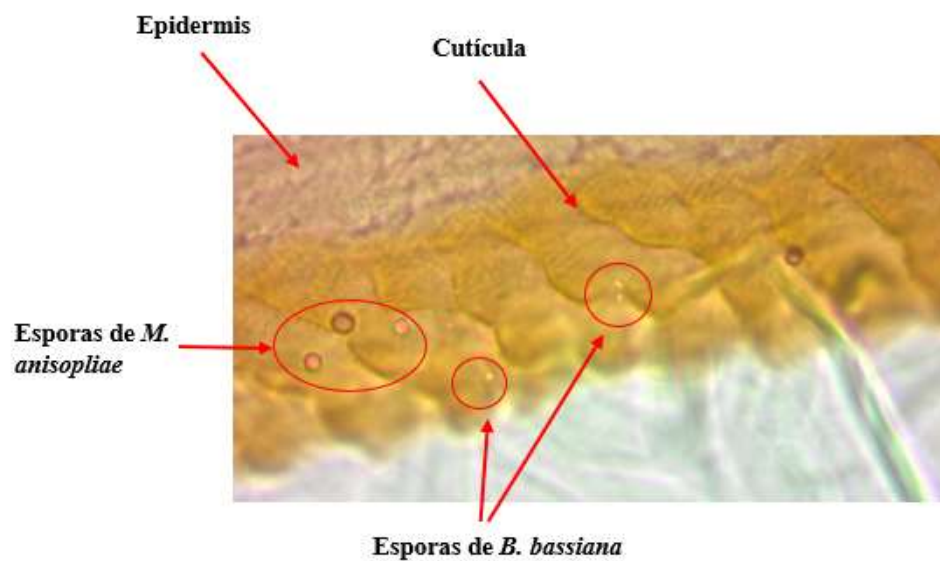


Figura 56. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

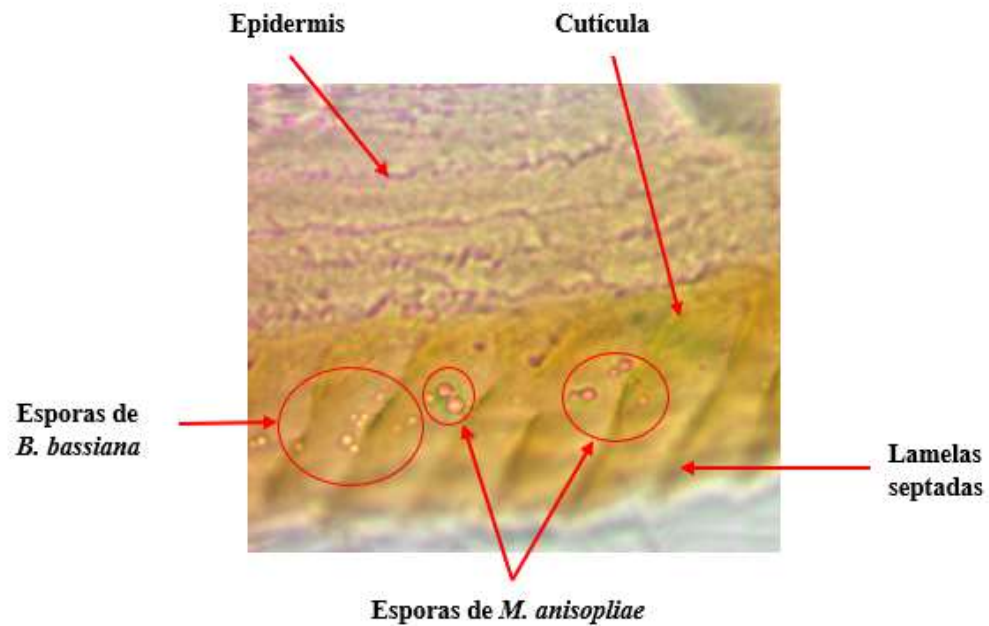


Figura 57. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

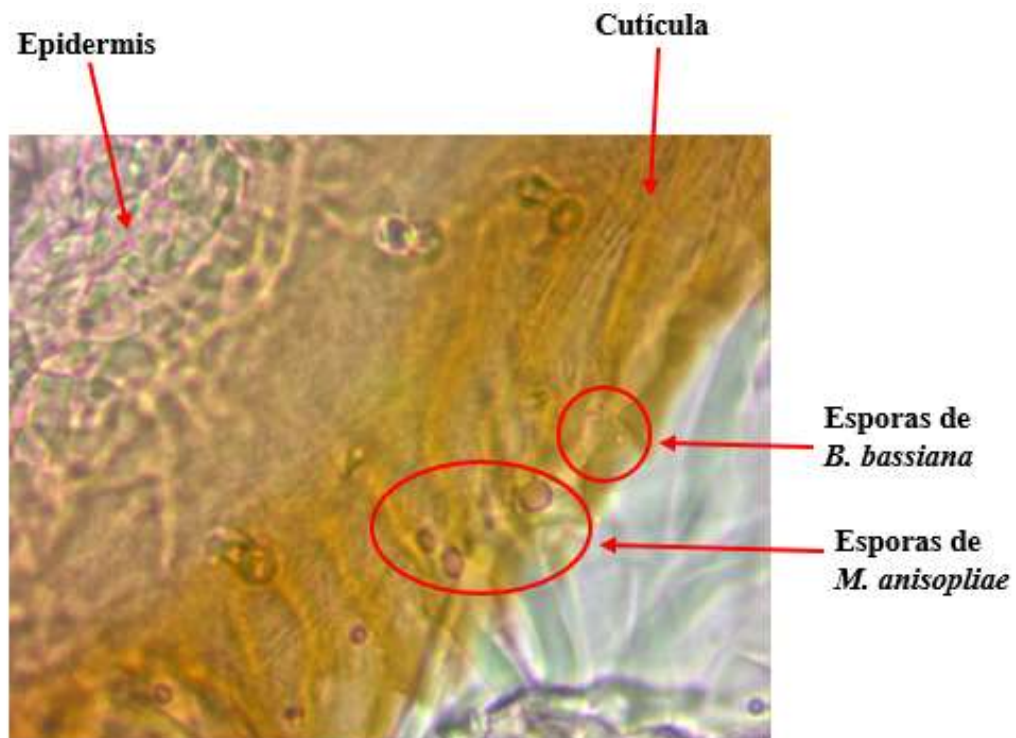


Figura 58. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.

Realizado por Pólit & Echeverría (2023).

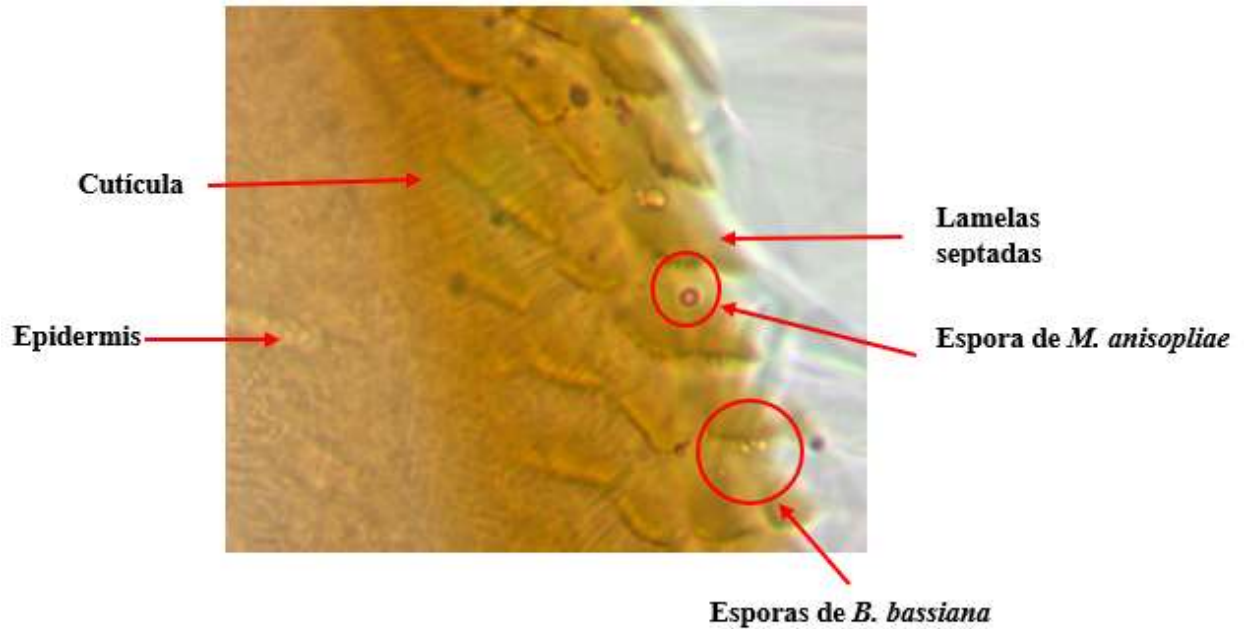


Figura 59. Visualización de integumento en un objetivo de 100X.

Realizado por Pólit & Echeverria (2023).

Las muestras extraídas para cortes fueron de insectos con mayor visualización de infección, en esta etapa el hongo ya se había expandido por los órganos y estructuras internas y externas del insecto, por lo tanto, los resultados observados se dan en el estadio de infección en donde el hongo llega a la epidermis y emerge a través de la cutícula, capa que se encuentra encima de la epidermis, en el cual se da la formación de los conidios que liberarán esporas al medio ambiente para comenzar de nuevo un ciclo de infección.

4.11. *Discusión de resultados*

Los resultados obtenidos presentan similitudes con el estudio realizado por Dávila (2020) que probó la eficacia de una formulación sólida y líquida de *B. bassiana* en ejemplares de picudo negro, obteniendo que el primer tratamiento presentó una tasa de mortalidad del 36% mientras que la del segundo fue del 44%. De manera similar, Armendáriz et al., (2016) realizó dos infecciones separadas en picudo negro, de tal manera que la primera infección presentó 46,70% de individuos muertos mientras que, para la segunda infección, la mortalidad fue del 16,20%, por lo que, si bien los resultados fueron similares para el primer tratamiento, variaron drásticamente para el segundo.

En cambio, los resultados difieren con la investigación llevada a cabo por Moreno (2022) que evaluó siete aislados de *B. bassiana* sobre individuos de picudo negro donde se obtuvo que los tratamientos uno y dos fueron los más efectivos proporcionando una mortalidad del 18,89 y 16,67%, lo cual es un valor bajo en comparación con los estudios mencionados.

Por otro lado, los resultados que se obtuvieron no son consistentes con estudios similares como es el caso de Garófalo (2020) que utilizó dos cepas comerciales de *M. anisopliae* para infectar ejemplares de picudo negro, obteniendo una tasa de mortalidad del 40% para la cepa 1 y del 64% para la cepa 2. De igual manera, un estudio llevado a cabo por Gil (2017) presentó una mortalidad del 58,02% al mes de infección de los individuos de picudo negro. Finalmente, Agüero et al., (2009) que realizó una investigación parecida a las ya mencionadas, obtuvo como resultado un 51,7% de individuos muertos a causa del hongo.

El uso combinado de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* si mostró resultados similares a los conseguidos en el proceso experimental. El estudio de Agüero et al., (2009) también realizó una infección de cepas combinadas en los ejemplares de picudo negro, donde se obtuvo

un 88,4% de mortalidad. Suceso parecido al del estudio de Dávila et al., (2022) donde la combinación de dichas cepas dio lugar a una tasa de mortalidad del 78%, lo que indica que, la acción de ambas especies al mismo tiempo potencia la infección.

La información existente acerca de estudios en los que se trabaja con cortes anatómicos e histológicos de insectos es limitada, es decir no hay profundidad de datos sobre estructuras como órganos o tejidos infectadas por hongos entomopatógenos.

Un estudio llevado a cabo por Osman et al., (2015) consistió en estudiar cambios morfológicos e histológicos en especímenes de *Blaps polychresta* (coleóptero) que sirvieron como biomonitores de la contaminación del suelo por cadmio. Los insectos mostraron alteraciones externas al disminuir su composición corporal, mientras, la anatomía interna de sus órganos sexuales sufrió una reducción de tamaño, produciéndose deformidades en su estructura natural. En el proceso histológico, se realizaron cortes transversales en las gónadas e intestino medio para ambos sexos. Los cortes de testículo mostraron acinos testiculares anormales, que, en ciertos casos se encontraban contraídos o agrandados, con presencia de espermatoцитos desintegrados. Los cortes sagitales realizados a nivel del intestino mostraron rupturas en el epitelio, así como separación de la capa epitelial y muscular.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* son capaces de coexistir en el mismo entorno sin establecer una relación de competencia que afecte al desarrollo de uno de estos. Por lo tanto, el uso combinado de los mismos en ejemplares de picudo negro potencia la infección, y como resultado, la tasa de mortalidad en el insecto será mayor.
- El uso de cortes anatómicos e histológicos en los especímenes de picudo negro permitió observar el avance del proceso infeccioso e invasivo de las cepas utilizadas a nivel macroscópico y microscópico. Por ende, se pudo profundizar en los mecanismos utilizados por los hongos entomopatógenos para infectar y desarrollarse a través de sus huéspedes.
- Esta investigación presenta resultados útiles para el desarrollo de nuevos métodos de control biológico de plagas asociadas al banano, en reemplazo de sustancias químicas potencialmente dañinas para el ecosistema relacionado.

5.2. Recomendaciones

- La aplicación de las cepas en solución líquida presentaría mejores resultados debido a la facilidad de penetrar a través del pseudotallo del banano.
- Los picudos negros son activos en la noche, por lo tanto, se recomienda trabajar con ellos durante el día para facilitar su manipulación.
- Uno de los mecanismos de defensa del picudo negro es quedarse inmóvil durante varios minutos aparentando estar muerto. Para saber con certeza si el ejemplar sigue

vivo, lo ideal es frotar el abdomen con una pinza, lo que provocará que estos realicen pequeños movimientos con las patas.

- Los picudos negros tienden a pelearse entre ellos, y suelen arrancarse la cabeza, por lo tanto, es preferible evitar dejarlos mucho tiempo encerrados entre ellos.
- Se deberían probar e investigar más modelos de trampas para la recolección de picudos negros.
- Profundizar sobre los estudios anatómicos e histológicos del picudo negro y otras especies de insectos plaga, así como los mecanismos de infección por parte de hongos entomopatógenos a nivel macroscópico y microscópico con el fin de obtener conocimientos que permitan el desarrollo de nuevas y mejores alternativas para el control biológico de plagas.
- Dada la capacidad de estos hongos para infectar multitud de especies consideradas plaga para una gran diversidad de cultivos, se recomienda realizar estudios en distintos tipos de insecto con el fin de fomentar alternativas de control biológico eficientes y a favor del medio ambiente.

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ANEXOS

6.1. Referencias bibliográficas

- Abagale, S. A., Woodcock, C. M., Chamberlain, K., Osafo-Acquaah, S., van Emden, H., Birkett, M. A., Pickett, J. A., & Braimah, H. (2019). Attractiveness of host banana leaf materials to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* in Ghana for development of field management strategies. *Pest management science*, 75(2), 549–555. <https://doi.org/10.1002/ps.5182>
- Abreu, S. F., Cuervo, A. M. G., & García, A. G. (2018). Histología del cerebro del escarabajo buceador Gyretes (Brullé, 1835)(Coleoptera: Gyrinidae). *Boletín de la SEA*, (63), 248-252.
- Agudelo Becerra, D., Beltran Espitia, K. A., & Bolivar Perez, J. (2021). Revisión sobre los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma* spp como biocontrol de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
- Agüero Alaniz, J. G., Escoto Calderón, J. N., & Juárez Zapata, E. A. (2009). Evaluación de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* y la cepa, Monte Rosa, de *Metarhizium anisopliae* para el manejo de *Cosmopolites sordidus*. Campos Agropecuario 1 y 2 de la UNAN León, 2009 (Doctoral dissertation).
- Agurto, C. D. G., Guerrero, J. N. Q., & Batista, R. M. G. (2019). Alternativas para el control de picudo negro (*Cosmopolites Sordidus* G.) en el cultivo de banano convencional. *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(2), 103-110.
- Alzate Acevedo S, Díaz Carrillo ÁJ, Flórez-López E, Grande-Tovar CD. Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a Circular Economy.

- Molecules. 2021 Aug 31;26(17):5282. doi: 10.3390/molecules26175282. PMID: 34500714; PMCID: PMC8434441.
- Amini Khoozani, A., Birch, J., & Bekhit, A. E. A. (2019). Production, application and health effects of banana pulp and peel flour in the food industry. *Journal of food science and technology*, 56(2), 548–559. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-03562-z>
- Argüelles Palomino, D. (2016). Efecto de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio y otras especies de culícidos en condiciones de campo (Bachelor's thesis).
- Armendáriz, I., Landázuri, P. A., Taco, J. M., & Ulloa, S. M. (2016). Efectos del control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en el plátano. *Agronomía mesoamericana*, 319-327.
- Arraiza, N., Viguria, P. M., Navarro, J., & Ainciburu, A. (2001). *Manual de microscopia*. Auxilab SL.
- Bajaña Sánchez, G. B. (2020). Evaluación de trampas etológicas para el control de *Cosmopolites sordidus* en la plantación de banano (*Mussa AAA*) Cantón Pueblo Viejo (Bachelor's thesis, BABAHOYO; UTB, 2019).
- Bastidas Chamorro, V. B. (2022). Efecto de *Beauveria bassiana* para el control de insectos plaga en el cultivo de gandul (*Cajanus cajan* L.) en el cantón Daule provincia del Guayas (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil: Facultad de Ciencias Agrarias).
- Bermeo Ureña, D. P. (2022). Determinación de la actividad entomopatógena del hongo *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. sobre el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes Vorax* H.) (Bachelor's thesis).

- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J. B., Vainstein, M. H., Schrank, A., Bittencourt, V. R. E. P., & Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental parasitology*, 208, 107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Breitsohl, H. (2019). Beyond ANOVA: An introduction to structural equation models for experimental designs. *Organizational Research Methods*, 22(3), 649-677.
- Chabla Salas, F. A. (2021). Evaluación de nematicidas en la reducción de la población de *Radopholus similis* en el cultivo de banano Musa AAA en la parroquia de Pancho Negro, cantón la Troncal, provincia del Cañar (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil).
- Chiriboga, D. I. (2018). USO DE ALOE VERA PARA EL CONTROL DE PUDRICIÓN DE CORONA EN LA FRUTA DE BANANO (MUSA AAA). Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias Carrera de Ingeniería Agronómica, 51.
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Beauveria Bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras. Paraguay: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. coffee beans fermentation analysed using Illumina-based amplicon sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Claudio Espinoza, I. D. (2020). Efecto de *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium Anisopliae* en el control del gorgojo negro del plátano (*Cosmopolites Sordidus*), en las Condiciones Agroecológicas en el Distrito de Monzón-2019.

- David, B. S. K. (2020). Manejo etológico del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en el cultivo de banano (*Musa acuminata* AAA), Jujan-Guayas (Doctoral dissertation, Universidad Agraria Del Ecuador).
- Dávila Guerra, K. W. (2020). “Eficacia de la aplicación líquida y sólida del hongo *Beauveria bassiana* para el control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y del picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) en condiciones de laboratorio y campo” Autor: Dávila Guerra Kevin William Director del Proyecto de Investigación: Dra. Mayra Carolina Vélez Ruiz Quevedo–Los Ríos–Ecuador 2020 (Bachelor’s thesis, Quevedo: Ecuador).
- Dávila, R. P. G., Cedeño, J. V., Troya, E. T. T., & Mejía, J. L. M. (2022). Biocontrol de *Cosmopolites sordidus* (Germar) en plantaciones de Musa AAB del Carmen, Manabí, Ecuador. *RECIAMUC*, 6(4), 129-135.
- Domínguez Gámez, M. (2020). Efectividad de un bio-insecticida fúngico con adición de atrayentes, aplicado en trampas para el control de *Aedes aegypti* (L.) (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Kulmanbetova, A., Zholdoshbekova, S., & Kyzy, A. A. (2019). Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan. *Journal of invertebrate pathology*, 167, 107243.
- Espinoza, A., Vivas Vivas, L., Lara, E., & Pico, J. (2004). Manejo del picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) Con el hongo entomopatógeno *Beauveria Bassiana* (Bals), Vuill.
- Faria, M., Mascarin, GM, Butt, T. et al. Producción en finca de entomopatógenos microbianos para uso en agricultura: Brasil como estudio de caso. *Neotrop Entomol* 52 , 122–133 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13744-023-01033-5>

- Fernández Aguirre, J. L. (2020). Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Bachelor's thesis).
- Fernández Bao, S. (2020). Diseño de experimentos: Diseño factorial (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- García, C., & Sánchez, F. (2021). Uso de los residuos de la cáscara de banano (musa paradisiaca), para la elaboración de material plástico biodegradable, ESPAM MFL (Doctoral dissertation, Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López. Repositorio institucional–ESPAM MFL. <http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/1429/1/TTMA21D.pdf>).
- Garófalo Mora, R. A. (2020). *Eficacia de dos cepas comerciales de Metarhizium anisopliae en el control de picudo negro (Cosmopolites sordidus) y picudo rayado (Metamasius hemipterus) en condiciones de campo y laboratorio* (Bachelor's thesis, Quevedo: Ecuador).
- Gil, J., (2017). Evaluación de dos cepas de *Beauveria bassiana* (Báls.) y una cepa de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de adultos del gorgojo del banano, *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera, Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio [Tesis, Universidad Privada Antenor Orrego – UPAO]. <https://hdl.handle.net/20.500.12759/3576>
- Goldberg, D. E., & Scheiner, S. M. (2020). ANOVA and ANCOVA: field competition experiments. In *Design and analysis of ecological experiments* (pp. 69-93). Chapman and Hall/CRC.

- Goyes Carrasco, J. J. (2020). Descripción del picudo rayado (*Metamasius hemipterus* L) en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020).
- Gualsaqi Panamá, J. G. (2022). Evaluación del hongo entomopatógeno *beauveria bassiana* en los cuatro estadios de desarrollo de la mosca blanca (*bemisia tabaci*) en la Granja Experimental La Pradera (Bachelor's thesis).
- Han, S. R. K., Antúnez, C. C. C., de López, M. B. R., & Barret, B. R. G. (2022). Parasitoides de larvas del Orden Lepidoptera en cultivos hortícolas en el Campus Universitario de San Lorenzo, Paraguay Larvae parasitoids of the order lepidoptera in vegetable crops in San Lorenzo, Paraguay. *Revista Científica de la UCSA*, 9(1), 15-23.
- Herrera, A. (2021). Control de la pudrición de corona de la fruta de banano a diferentes dosis de extracto etanólico de canela. Universidad Técnica de Machala. Machala-Ecuador.
- Jaramillo, Jorge L., Montoya, Esther C., Benavides, Pablo, & Góngora B., Carmenza E. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de brocadel café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología*, 41(1), 95-104. Retrieved August 23, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882015000100015&lng=en&tlng=es.
- Jazmin, R. L. A. (2022). Evaluación de cebos y trampas en la captura de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en banano (Doctoral dissertation, Universidad Agraria Del Ecuador).
- Kim Han, S. R., Cabral Antúnez, C. C., Ramírez de López, M. B., & Garcete Barret, B. R. (2022). Parasitoides de larvas del Orden Lepidoptera en cultivos hortícolas en el

- Campus Universitario de San Lorenzo, Paraguay. *Revista Científica de la UCSA*, 9(1), 15-23.
- Kraševc, N., Panevska, A., Lemež, Š., Razinger, J., Sepčić, K., Anderluh, G., & Podobnik, M. (2021). Lipid-Binding Aegerolysin from Biocontrol Fungus *Beauveria bassiana*. *Toxins*, 13(11), 820. <https://doi.org/10.3390/toxins13110820>
- López Chanalata, Á. L. (2020). Incidencia y control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en el cultivo de plátano en el Ecuador (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2020).
- López, E. S., Lira, A. J. R., & Pacheco, Y. V. P. (2019). Planeación para la generación de un programa para construir estructuras de alias para diseños factoriales fraccionados de niveles mixtos (Planning for the generation of a program to build alias structures for mixed levels fractional factorial designs). *Pistas Educativas*, 41(133).
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133.
- Maldonado Vargas, C. E., & Meza Zambrano, O. S. (2018). Uso de trampas con atrayentes para el control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus* germar) y rayado (*Metamasius hemipterus* L.) En el cultivo de plátano (Doctoral dissertation).
- Manfrino, R. G., D'alessandro, C. P., Lecuona, R. E., & Lopez Lastra, C. C. (2020). Uso de los hongos entomopatógenos para el control microbiano de artrópodos en cultivos hortícolas.
- Martínez, M. I. (2002). Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 30, 187-195.

- Mekhrinigor, Y. (2021). Statistical Programs In The Teaching Of Physical Education Classes. *Turkish Journal of Computer and Mathematics Education (TURCOMAT)*, 12(7), 354-356.
- Molina, M. (2019). Incidencia del picudo negro y picudo rayado en plantación de banano con manejo orgánico y convencional (Doctoral dissertation, Tesis de Ingeniería Agronómica. Guayaquil, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil).
- Moreno Mancilla, G. R. (2022). Evaluación de aislados de *Beauveria* SPP, y dos formulados sobre picudo negro (*Cosmopolites sordidus* gemmar) del plátano en La Joya de los Sachas.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90.
- Ortiz-Urquiza, A. (2021). The split personality of *Beauveria bassiana*: understanding the molecular basis of fungal parasitism and mutualism. *Msystems*, 6(4), e00766-21.
- Osman, W., M. El-Samad, L., Mokhamer, E. H., El-Touhamy, A., & Shonouda, M. (2015). Ecological, morphological, and histological studies on *Blaps polycresta* (Coleoptera: Tenebrionidae) as biomonitors of cadmium soil pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 14104-14115.
- Palmieri, L., Pavarini, R., & Sharma, P. P. (2022). Draft Genome Sequence of “Candidatus *Nardonella dryophthoridicola*” Strain NARMHE1, Endosymbiont of *Metamasius hemipterus* (Coleoptera, Curculionidae, Dryophthorinae). *Microbiology resource announcements*, 11(11), e0073822. <https://doi.org/10.1128/mra.00738-22>

- Pen, R. Z. (2019). Planirovaniye eksperimenta v Statgraphics Centurion.[Planning an experiment at Statgraphics Centurion]. Krasnoyarsk, 2014, 293 p. *Russ.*) *Received April, 21.*
- Peñaloza Romaniello, C. M. (2020). Evaluación de la efectividad de la cepa BeA de *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin para el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856)(Hemiptera: aleyrodidae) en el cultivo de tomate.
- Pérez Hoyos, A. M., & Amat García, E. C. (2018). Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico y almacenamiento de genitales de moscas (Diptera: Calyptratae).
- Polo, W. A. (2021). *Evaluación de insecticidas botánicos sobre trips (Chaetanaphotrips signipennis) en el cultivo de banano, en la finca “Julia María”, parroquia Isla del Bejucal, cantón Baba, provincia Los Ríos, Ecuador* (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2021).
- Pozo Álava, A. A. (2022). *Beauveria bassiana para el control de Cosmopolites sordidus en el cultivo de banano (Musa sapientum) en la provincia de Los Ríos* (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2022).
- Ramírez Estrada, Y. P. (2020). Evaluación de la eficacia de *Beauveria bassiana* y *metarhizium* spp. En el control de Picudo Rayado de Caña de Azúcar en condiciones de Campo Fátima–Pastaza (Bachelor's thesis, Universidad Estatal Amazónica).
- Ramos campo, K. L. (2019). Encapsulación de esporas de *metarhizium anisopliae* y su efecto sobre hongos patógenos en el desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

- Regalado, J. G., Plaza, A. M., & Sánchez, C. P. (2019). *Amenazas de las manchas foliares de Sigatoka, Mycosphaerella spp., en la producción sostenible de banano en el Ecuador*. Revista Verde de Agroecología e Desarrollo Sustentável, 14(5), 591-596.
- Rodríguez-Quispe, S. P., Ortiz-Oblitas, O., & Castillo-Valiente, J. R. (2023). Evaluación del impacto ambiental de los pesticidas utilizados para el control de plagas en los principales cultivos hortícolas en el valle de Chancay-Huaral, Lima. *Peruvian Journal of Agronomy*, 7(1), 1-19.
- Ronquillo Moran, A. R. (2021). Control biológico del picudo de las bananeras *Cosmopolites sordidus* Germar con el uso de varias cepas *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio (Master's thesis, BABAHOYO: UTB, 2021).
- Saltos Enríquez, D. F., & Vera Ayala, O. N. (2022). Evaluación de trampas para el control de picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y rayado (*Metamasius hemipterus*) con la incorporación de dos insecticidas en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en el cantón La Maná, provincia de Cotopaxi (Bachelor's thesis, Ecuador: La Maná Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Sánchez Bravo, J. G., & Vélez López, A. M. (2021). Incidencia del *Metarhizium anisopliae* sobre la entomofauna benéfica de cultivos de maíz bajo condiciones de campo controladas en la ESPAM MFL (Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL).
- Suarez Quintero, J. E., & Suarez Quintero, L. J. (2020). Efectividad del hongo *Beauveria bassiana* en trampas para el manejo del picudo del cultivo de plátano (*Cosmopolites sordidus*: Coleoptera-Curculionidae) Tonalá-Chinandega, 2019 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).

- Suárez Quintero, L. J., Suárez Quintero, J. E., & Monzón Ruíz, V. (2021). Manejo del picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus* Germar) Coleoptera: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* Bals y Vuils, Tonalá-Chinandega, Nicaragua. *La Calera*, 21(36), 30-35.
- Torres Lamilla, J. J. (2019). Manejo Integrado de picudo negro (*cosmopolite sordidus* germar) en el cultivo de banano (*musa AAA*) (Bachelor's thesis, Babahoyo: UTB, 2019).
- Utreras Vinueza, C. B. (2021). Aislamiento y evaluación de dos bacterias entomopatógenas como potenciales agentes de biocontrol para *Tetranychus urticae* en cultivos de rosas *Rosa* spp. de una florícola, Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25680/1/T-ESPE-044708.pdf>
- Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., ... & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
- Villalobos, A., Agudelo, J. C., & Arrieta, D. M. (2010). Histología de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera) como aporte entomológico: Parte I: Regiones corporales, organización anatómica e integumento. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 14(2), 201-214.
- Villanueva Delgado, L. (2023). Uso de trampas con atrayentes para controlar picudo negro (*Cosmopolites sordidus* G.) y rayado (*Metamasius hemipterus* L.) en cultivo de plátano, Cajaruro, Amazonas (Doctoral dissertation, Universidad Politécnica Amazónica).

6.2. Anexos

6.2.1. Glosario de términos

Adhesinas: Son proteínas presentes en ciertos microorganismos que permiten la unión de estos a la superficie de la célula huésped.

Agente simbiótico: Son organismos que establecen una estrecha relación de beneficio mutuo interactuando de manera continua para la supervivencia, crecimiento, reproducción, etc.

Agroecosistema: Ecosistema formado por la interacción entre los factores bióticos y abióticos en un área dedicada a la agricultura.

Anatomía: Es una rama de la biología encargada de estudiar la estructura interna de los organismos vivos.

Apresorio: Es una estructura presente en algunos hongos parásitos que tiene como finalidad permitir el anclaje y penetración del hongo en su hospedero.

Artrópodo: Son aquellos animales invertebrados pertenecientes al filo Arthropoda. Lo constituye una gran variedad de especies como insectos, arácnidos, crustáceos, entre otros.

Biocontrol: Estrategia utilizada en la agricultura que tiene como finalidad controlar las poblaciones de plagas mediante el uso de organismos vivos.

Biopesticida: Es un producto cuya formulación es a base de organismos vivos y se utiliza para el control de plagas agrícolas.

Cepas: Se refiere a una población de una especie que descende de una única célula o muestra.

Clorosis: Condición en la cual hojas o tejidos vegetales sufren decoloración.

Conidióforos: Es una estructura especializada en la reproducción asexual en ciertos hongos. Participa en el sostén y producción de esporas denominadas conidios.

Conidios: Es una spora asexual presente en algunos hongos que se forma a partir de una estructura denominada conidióforo.

Cormo: Órgano subterráneo presente en ciertas plantas que sirve como reserva de nutrientes para la misma.

Entomopatógeno: Se refiere a todo microorganismo capaz de infectar y provocar enfermedades en insectos.

Especímenes: Término utilizado para referirse a los individuos de una especie que está siendo objeto de estudio con fines científicos.

Esporas: Son estructuras reproductivas especializadas que no requieren ser fecundadas presentes en diversos organismos como plantas, bacterias y hongos.

Estadio: Etapa o fase en el desarrollo de un organismo.

Fitosanitario: Se refiere a cualquier producto utilizado en la agricultura con el fin de cuidar a las plantas de plagas o enfermedades.

Genomas: Conjunto completo del material genético presente en un organismo.

Hemocele: Cavidad presente en los invertebrados encargada de contener la hemolinfa.

Hemolinfa: Fluido presente en el sistema circulatorio de los invertebrados.

Híbridos: Ser vivo producto del cruce de dos o más especies.

Hifas: Son estructuras filamentosas presentes en ciertos hongos que en conjunto forman una red denominada micelio.

Histología: Rama de la biología encargada del estudio de los tejidos y su estructura.

Micelio: Estructura propia de los hongos formada por una red de filamentos denominados hifas.

Microorganismos antagonistas: Son aquellos microorganismos que compiten, controlan o inhiben la actividad de otros microorganismos.

Microorganismos sinergistas: Son aquellos microorganismos de manera cooperativa estableciendo una interacción de beneficio mutuo.

Necrosis: Muerte de células y tejidos en una zona determinada producto de daños irreparables.

Patógenos: Es todo organismo sea bacteria, hongo o virus capaz de producir enfermedades a otros organismos como plantas, animales y el ser humano.

Proliferación: Se refiere al crecimiento rápido de células, organismos o estructuras biológicas.

Pseudotallos: Estructura similar a un tallo, pero que realmente está constituido por la superposición de hojas. Es propia de plantas del género Musa a la cual pertenece el banano.

Pupas: Es una etapa de desarrollo presente en algunos insectos. Representa la etapa intermedia entre el estado de larva y adulto del insecto.

Saprófito: Son aquellos organismos que obtienen su fuente de nutrientes a partir de materia orgánica en descomposición.

Taxonomía: Disciplina que se encarga de clasificar, describir y nombrar a los seres vivos.

6.2.2. *Abreviaturas*

ANOVA: Analysis of Variance

BB: *Beauveria bassiana*

CEP: Control Estadístico de Procesos

CO: Combinado (Cepas)

FA: Factor A

FB: Factor B

MA: *Metarhizium anisopliae*

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PIB: Producto Interno Bruto

T1: Tratamiento 1 – testigo

T2: Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3

T4: Tratamiento 4

YPD: Yeast extract peptone dextrose

KOH: Hidróxido de Potasio

6.2.3. *Imágenes complementarias*

Picudos negros en las trampas tipo sándwich



Abertura de las trampas para la recolección de las muestras



Método de Control químico mediante el uso de dron.



Extracción de picudos negros de los tallos



Presencia de clorosis en cultivos, efecto colateral causado por el daño del picudo negro.



Identificación molecular de la cepa B. bassiana

INFORME DE RESULTADOS #B-111

Nombre del Proyecto: Identificación molecular aislado Microbiolab MB009

Informe: B-111

Analista: Ing. Francisco Mosquera-Yuqui

Fecha: 2 de diciembre de 2020

RESUMEN

Muestra	Código BioSin	Long (pb)	Calidad (%)	Barcode	Organismo	Identidad (%)	N° Acceso GenBank
BROULOKY	MB009	540	97.9	ITS	<i>Beauveria bassiana</i>	100	MT635020.1

SOFTWARE UTILIZADO

- FinchTV v1.4.0
- Geneious v11.1.5

ANEXO

A1. Electroferogramas

<https://drive.google.com/drive/folders/1kVLNRgRerw1wDnA76lmbamPm2fna0p6S?usp=sharing>

A2. Secuencias consenso barcode ITS

<https://drive.google.com/file/d/1RuOLYertsx3ybhHSZDdw79Mefl8kBLBw/view?usp=sharing>

DETALLE DE RESULTADOS

Nombre del Proyecto: Identificación molecular bacteria Microbiolab MB009

Informe: B-1011

Analista: Ing. Francisco Mosquera-Yuqui

Fecha: 2 de diciembre de 2020

Estudio

Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación del barcode ITS, purificación, secuenciación Sanger, limpieza de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos

Muestras usadas: Aislado puro en caja Petri.

Método de determinación: Identificación molecular por barcoding.

Procedimiento

- La extracción de ADN se realizó por método convencional mecánico-químico utilizando aproximadamente 5 mg de biomasa.
- El ADN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro nanodrop, donde todos cumplieron con parámetros de concentración y calidad.
- Se realizó una PCR convencional amplificando el barcode ITS, utilizando los primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). El volumen de reacción fue de 25 μ L (Tabla 1) y las condiciones de PCR son indicadas en Tabla 2.
- Luego de correr una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Figura 1), los productos de PCR fueron purificados.
- La secuenciación SANGER se realizó para las hebras de ADN molde y complementaria.
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando los programas bioinformáticos FinchTV v1.5.0 y Geneious v11.1.5.

Tabla 1. Componentes de reacción de PCR convencional para cada muestra ensayada

COMPONENTE	Volumen
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	12.5 uL
Primer forward (10 μ M)	1.0 uL
Primer reverse (10 μ M)	1.0 uL
ADN template	100-150 ng
Agua libre de nucleasas	a 25 uL
Volumen total	25 uL

Tabla 2. Condiciones de PCR convencional para barcode ITS

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	54	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

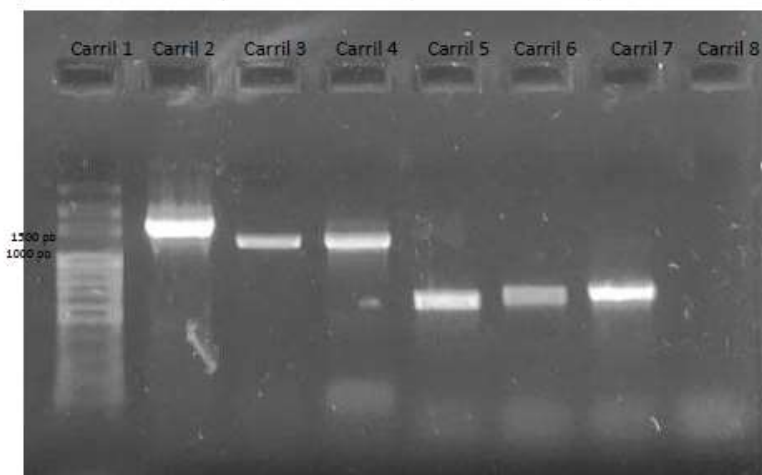


Figura 1. Electroforesis horizontal de los productos de PCR convencional de varias muestras. Marcador molecular DNA Land Scientific 100 pb (Carril 1), MB006_16S (Carril 2), MB007_16S (Carril 3), MB008_16S (Carril 4), MB009 ITS (Carril 5), MB010 ITS (Carril 6), MB011 ITS (Carril 7), control negativo 16S (Carril 8). Gel de agarosa al 1% en TBE 1X.



CONCLUSIONES

A partir de una extracción satisfactoria de ADN se amplificó el barcode ITS de la muestra MB009 y se logró identificar molecularmente (tabla principal) a *Beauveria bassiana*.

FIRMA AUTORIZADA
Ing. Francisco Mosquera-Yuqui
BioSin-Biociencias

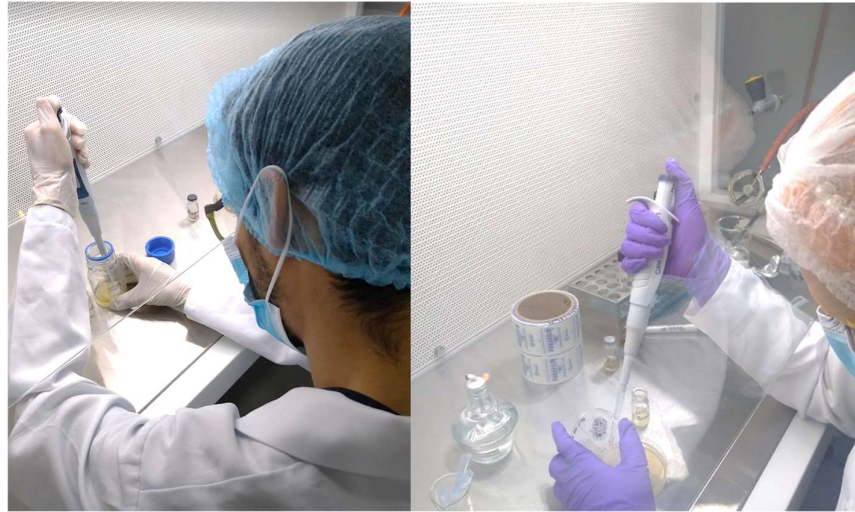
Ficha técnica de laboratorio del M. anisopliae

LABORATORIO MCP		
FICHA TÉCNICA		
Nombre Comercial	Metarizium	
Descripción	<i>Metarhizium anisopliae</i>	
Propiedades fisicoquímicas	Olor	Suigéneris
	Estado	Líquido
	Color	Verde
	pH	7
Control de calidad biológico	Concentración	≥ 1x10 ⁸ unidades formadoras de colonias
	Pureza	≥ 95%
	Viabilidad	≥ 95%
Mecanismos de acción	Comienza por la adhesión del tegumento y la germinación de los conidios o esporas sobre este. Luego se produce la penetración a través de la cutícula del insecto, la multiplicación del hongo en el hemocele y la producción de toxinas (en ciertos hongos y cepas). Sobreviene la muerte del insecto y el hongo coloniza todo el interior del hospedante. Posteriormente, el micelio sale hacia el exterior pasando a través del tegumento, esporula sobre la superficie del insecto y finalmente los propágulos son diseminados al medio.	
Objetivos biológicos	Afecta a insectos del orden Coleóptera y Homóptera.	
Dosis y aplicación	Foliar o Suelo: El líquido se disuelve 1 L en 100-200 L de agua para 1 hectárea. / Semillas: 1 l para 15-20 kg de semilla / Plántulas: 250 ml en 2,5 litros. Frecuencia recomendada: Cada 8-15 días para rápida colonización. Más información consultar con el técnico responsable Debido a que se trata de un organismo vivo, es necesario que exista un mínimo de materia orgánica en el suelo, si esta se encuentra baja, se recomienda repetir al menos una vez	
Formas de aplicación	Vía	Líquida
	Recomendación	Las aplicaciones siguientes se deben realizar a partir de la primera, a ritmo regular, en dependencia siempre de la velocidad de desarrollo del cultivo (aparición de nuevas áreas no protegidas) y de las condiciones ambientales existentes Agite bien el producto antes de su uso. Es recomendable su aplicación a una temperatura óptima mayor a los 20°C con una Humedad Relativa entre el 70-80%
Estabilidad	El producto permanece estable durante 90 días bajo condiciones de refrigeración, almacenamiento y manejo establecidos	
Compatibilidad	El producto no es compatible con fertilizantes, fungicidas o plaguicidas químicos. El producto puede ser aplicado con otros productos biológicos y abonos orgánicos, siempre en cuando el pH sea entre 5-7 para hongos y 6-7 para bacterias.	
Aviso al comprador	El fabricante garantiza la composición y calidad del producto. No se responsabiliza por el uso imprudente, excesivo o indebido por parte del consumidor	
Categoría toxicológica	IV (Franja verde)	
Se prohíbe la reproducción parcial o total de este documento.		
Derechos Reservados Laboratorio MCP Ecuador		
PÁGINA WEB: www.microbiolabecuador.com		
EMAIL: microbiolabecuador@gmail.com		
CELULAR: +593 995 612 043		
CONTACTOS		
Microbióloga María Esther Cortez Pazmiño No Registro 1027-12-1174412		
Edición 04		
Fecha actualización diciembre 2018		

Ficha técnica de laboratorio de la B. bassiana

LABORATORIO MCP		
FICHA TÉCNICA		
Nombre Comercial	Beauveria bassiana	
Descripción	<i>Beauveria bassiana</i>	
Propiedades fisicoquímicas	Olor	Suigéneris
	Estado	Líquido
	Color	Blanca
	pH	7
Control de calidad biológico	Concentración	$\geq 1 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias
	Pureza	$\geq 95\%$
	Viabilidad	$\geq 95\%$
Mecanismos de acción	El hongo en contacto con el insecto entra en competencia con la microflora cuticular, produciendo un tubo germinativo que atraviesa el tegumento del insecto y se ramifica dentro de su cuerpo, secretando toxinas que provocan la muerte del hospedante. El insecto muerto queda momificándolo y bajo condiciones de humedad, se cubre posteriormente de una esporulación blanquecina – amarillenta.	
Objetivos biológicos	Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como Insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de las plantas como son las orugas, las termitas, las moscas blancas, los áfidos, los escarabajos o los tisanópteros, thrips, picudo.	
Dosis y aplicación	Foliar o Suelo: El líquido se disuelve 1 L en 100-200 L de agua para 1 hectárea. / Semillas: 1 l para 15-20 kg de semilla / Plántulas: 250 ml en 2,5 litros. Frecuencia recomendada: Cada 8-15 días para rápida colonización. Más información consultar con el técnico responsable Debido a que se trata de un organismo vivo, es necesario que exista un mínimo de materia orgánica en el suelo, si esta se encuentra baja, se recomienda repetir al menos una vez	
Formas de aplicación	Vía	Líquida
	Recomendación	Las aplicaciones siguientes se deben realizar a partir de la primera, a ritmo regular, en dependencia siempre de la velocidad de desarrollo del cultivo (aparición de nuevas áreas no protegidas) y de las condiciones ambientales existentes Agite bien el producto antes de su uso. Es recomendable su aplicación a una temperatura óptima mayor a los 20°C con una Humedad Relativa entre el 70-80%
Estabilidad	El producto permanece estable durante 90 días bajo condiciones de refrigeración, almacenamiento y manejo establecidos	
Compatibilidad	El producto no es compatible con fertilizantes, fungicidas o plaguicidas químicos. El producto puede ser aplicado con otros productos biológicos y abonos orgánicos, siempre en cuando el pH sea entre 5-7 para hongos y 6-7 para bacterias.	
Aviso al comprador	El fabricante garantiza la composición y calidad del producto. No se responsabiliza por el uso imprudente, excesivo o indebido por parte del consumidor	
Categoría toxicológica	IV (Franja verde)	
Se prohíbe la reproducción parcial o total de este documento. Derechos Reservados Laboratorio MCP Ecuador		
PÁGINA WEB: www.microbiolabecuador.com EMAIL: microbiolabecuador@gmail.com CELULAR: +593 995 612 043		
CONTACTOS		
Microbióloga María Esther Cortez Pazniño No Registro 1027-12-1174412		
Edición 04		
Fecha actualización diciembre 2018		

Activación de cepas



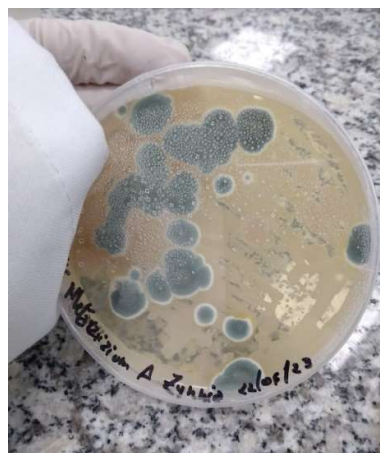
Soluciones seriadas



Infección de C. sordidus



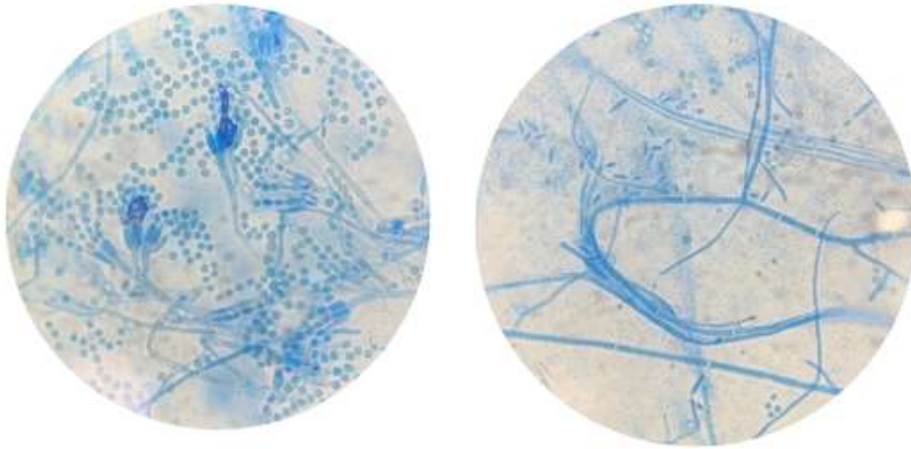
Cultivos de M. anisopliae



Cultivos de B. bassiana



Identificación microscópica de B. bassiana y M. anisopliae



Prueba Interspecifica entre Cepas



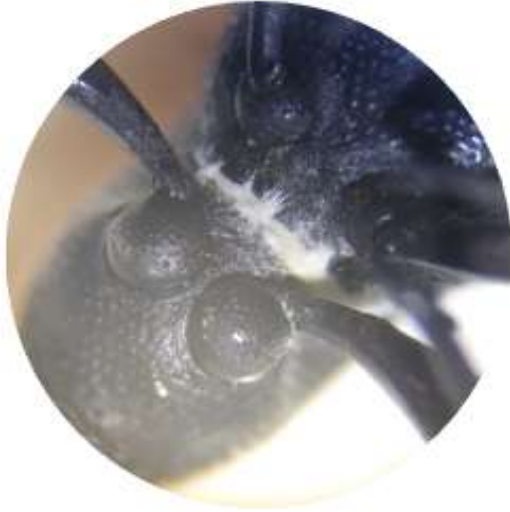
Infección de C. Sordidus en la primera semana de infección



Infección de C. sordidus en la segunda semana de infección



Infección de C. sordidus en la tercera semana de infección



Infección de C. sordidus en la cuarta semana de infección



Cortes Anatómicos



Esteriomicroscopios usados para la visualización interna y externa de los especímenes.



Reactivos para cortes histológicos



Microtomo con muestras parafinadas



Visualización de Cortes anatómicos



Visualización de tejidos de C. Sordidus

