



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

Beauveria sp. COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL
GUSANO DEFOLIADOR *Dione juno andicola* (Bates) EN *Passiflora*
ligularis (Juss.) A NIVEL DE LABORATORIO

Trabajo de grado previo a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario

AUTORA:

Paola Alexandra Tirira Aldaz

DIRECTORA:

Lic. Ima Sumac Sánchez de Cespedes MSc.

Ibarra, 2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

“*Beauveria* sp. COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL GUSANO DEFOLIADOR *Dione juno andicola* (Bates) EN *Passiflora ligularis* (Juss.) A NIVEL DE LABORATORIO”

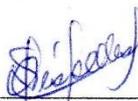
Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación
como requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERA EN AGROPECUARIA

APROBADO:

Lcda. Ima Sánchez M.Sc.

DIRECTOR



FIRMA

PhD. Julia Prado

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

MSc. Jefferson Andrade

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN A
FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO	
Cédula de identidad:	100361869-9
Apellidos y nombres:	Tirira Aldaz Paola Alexandra
Dirección:	Ibarra, Av. Atahualpa Bellavista de Caranqui, 45-39
Email:	patiriraa@utn.edu.ec
Teléfono fijo:	2650-780

DATOS DE LA OBRA	
Título:	<i>Beauveria sp.</i> como agente de control biológico del gusano defoliador <i>Dione juno andicola</i> (Bates) en <i>Passiflora ligularis</i> (Juss.) a nivel de laboratorio
Autor:	Tirira Aldaz Paola Alexandra
Fecha:	20 de abril del 2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
Programa	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
Título por el que opta	Ingeniera Agropecuaria
Director	Lic. Ima Sánchez MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 20 días del mes de abril del 2022

EL AUTOR



Paola Alexandra Tirira Aldaz

100361869-9

ACEPTACIÓN

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA-UTN

Fecha: Ibarra, a los 20 días del mes de Abril del 2022

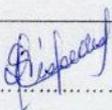
Nombres y Apellidos: *Beauveria* sp. como agente de control biológico del gusano defoliador *Dione juno* (Bates) EN *Passiflora ligularis* (Juss). Ingeniero Agropecuario.

Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Ibarra, a los 20 días del mes de Abril del 2022

DIRECTOR (A):

El objetivo principal de la presente investigación fue: Evaluar la efectividad de *Beauveria* sp. como agente de control biológico de la larva defoliadora *Dione juno* (Bates) en *Passiflora ligularis* (Juss).

Entre los objetivos específicos se encuentran: Caracterizar morfológicamente la cepa de *Beauveria* sp. en laboratorio, a través de mediciones de crecimiento radial y porcentaje de germinación. Determinar la patogenicidad de *Beauveria* sp. en larvas de *Dione juno* (Bates), bajo condiciones controladas en laboratorio.



.....

Lcda. Ima Sánchez M.Sc.

Directora de Trabajo de Grado



.....

Paola Alexandra Tirira Aldaz

Autor

AGRADECIMIENTO

Mi sincera gratitud a la Universidad Técnica del Norte por darme la oportunidad de formarme en el campo de la ciencia y la investigación, a mi facultad Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Carrera Ingeniería Agropecuaria, por acogerme en mi formación académica durante cinco años y permitirme contribuir con mi conocimiento.

Mi reconocimiento y agradecimiento a mi directora de tesis Lcda. Ima Sánchez, por creer en esta investigación y brindarme su apoyo de manera personal e institucional, al igual que a la Dra. Julia Prado por guiarme en el proceso y finalización de la misma.

A mi familia, por ser mi apoyo constante durante mi trayectoria universitaria, principalmente en mi proceso de titulación, ya que sin su apoyo no habría sido posible culminar mi trabajo de grado.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con profunda gratitud y cariño a mis padres Maribel y Franklin por su sacrificio y esfuerzo al ser mi apoyo incondicional durante la construcción de mi vida profesional, por siempre creer en mí y no dudar de mis capacidades. A mi apreciado abuelito Jorge y en memoria de mi abuelita Rosita por motivarme desde mi niñez a indagar en la ciencia a través de sus conocimientos, permitiéndome ser una niña independiente y feliz. A mis hermanas Rosita, Viktoria y Alejandra por sus palabras de aliento para ser siempre perseverante y lograr mis objetivos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
CAPITULO I.....	15
INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. ANTECEDENTES.....	15
1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	17
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	18
1.4. OBJETIVOS.....	19
1.4.1. Objetivo general.....	19
1.4.2. Objetivos específicos.....	19
1.5. HIPÓTESIS.....	20
1.5.1. Hipótesis nula.....	20
1.5.2. Hipótesis alternativa.....	20
CAPÍTULO II.....	21
MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. Pasifloras.....	21
2.1.1. <i>Passiflora ligularis</i> Juss.....	21
2.1.2. Plaga de granadilla <i>Dione juno andicola</i> (Bates).....	23
2.2. Manejo integrado de plagas y enfermedades.....	27
2.2.1. Control químico.....	27
2.2.2. Control biológico.....	28
2.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	31
2.3.1. Morfología.....	31
2.3.2. Taxonomía.....	32
2.3.3. Modo de acción.....	32
CAPÍTULO III.....	34
MARCO METODOLÓGICO.....	34
3.1. Descripción de la ubicación geográfica del área de estudio.....	34

3.2.	Materiales, equipos, insumos y herramientas	34
3.3.	Métodos.....	34
3.3.1.	Factores de estudio	34
3.3.2.	Tratamientos	37
3.3.3.	Diseño experimental	37
3.3.4.	Características de la unidad experimental	38
3.3.5.	Análisis estadístico	39
3.3.6.	VARIABLES A EVALUAR	40
3.4.	Manejo específico del experimento	42
3.4.1.	Áreas de trabajo.....	42
3.4.2.	Adquisición de materiales	42
3.4.3.	<i>Beauveria bassiana</i>	43
3.4.4.	Protocolo de esterilidad laboratorio	44
3.4.5.	Proceso de purificación de la cepa	44
3.4.6.	Desinfección y patogenicidad de la larva.....	45
3.4.7.	Determinación de concentración.....	45
3.4.8.	Caracterización fisiológica de <i>Beauveria</i> sp.	46
3.4.9.	Inoculación.....	47
3.4.10.	Inoculación de <i>Beauveria</i> sp. en <i>Dione juno</i> (Bates).....	47
3.4.11.	Alimentación del insecto.....	48
CAPITULO IV		49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		49
4.1.	Ciclo de vida <i>Dione juno</i> (Bates).....	49
4.2.	Porcentaje de Germinación	50
4.3.	Crecimiento radial.....	51
4.4.	Patogenicidad.....	52
CAPITULO V.....		56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		56
5.1.	Conclusiones	56
5.2.	Recomendaciones	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58
ANEXOS		63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Factores climáticos ideales para el cultivo de granadilla	23
Tabla 2 Medidas en milímetros y días de duración de <i>D. juno andicola</i> (Bates)	24
Tabla 3 Familias de virus entomopatógenos	29
Tabla 4 Principales hongos entomopatógenos utilizados comercialmente para el control de insectos plaga	31
Tabla 5 Materiales, equipos, insumos y herramientas	36
Tabla 6 Tratamientos del Experimento	37
Tabla 7 Características de la Unidad Experimental	39
Tabla 8 Esquema de varianza en Diseño de Bloques Completos al Azar con parcelas divididas (DBCA con PD)	40
Tabla 9 Análisis T para muestras independientes porcentaje de germinación	50
Tabla 10 Análisis de Crecimiento radial <i>Beauveria bassiana</i>	51
Tabla 11 Análisis Patogenicidad	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estadio del huevo	25
Figura 2 Larva en primer instar	25
Figura 3 Larva en quinto instar	26
Figura 4 Pupa	26
Figura 5 Estadio adulto	27
Figura 6 Micelio <i>Beauveria bassiana</i>	32
Figura 7 Larvas infectadas	33
Figura 8 Mapa base San José de Chaltura	35
Figura 9 Distribución de las parcelas experimentales	38
Figura 10 Crecimiento radial de la cepa <i>Beauveria bassiana</i>	41
Figura 11 Dimensiones del área de investigación	42
Figura 12 Recolección en campo larva <i>Dione juno andicola</i> (Bates)	43
Figura 13 <i>Beauveria bassiana</i> comercial	44
Figura 14 Esterilización material de vidrio	44
Figura 15 Desinfección <i>Dione juno</i> (Bates)	45
Figura 16 Determinación de concentración	46
Figura 17 Porcentaje de germinación	46
Figura 18 Inoculación <i>Beauveria bassiana</i>	47
Figura 19 Patogenicidad <i>Dione juno</i> (Bates)	47

Figura 20 Alimentación larva <i>Dione juno</i> (Bates).....	48
Figura 21 <i>Dione juno</i> (Bates)	49
Figura 22 Porcentaje de germinación	50
Figura 23 Porcentaje de germinación <i>Beauveria bassiana</i> a las 24h.....	51
Figura 24 Crecimiento radial <i>Beauveria bassiana</i>	52
Figura 25 Porcentaje de mortalidad.....	53
Figura 26 Porcentaje de mortalidad corregida	54
Figura 27 Porcentaje método de aplicación	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Medio de cultivo	63
Anexo 2 <i>Beauveria bassiana</i> comercial	64
Anexo 3 Reactivos y antibiótico.....	65

***Beauveria* sp. COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL GUSANO
DEFOLIADOR *Dione juno andicola* (Bates) EN *Passiflora ligularis* (Juss.) A NIVEL DE
LABORATORIO**

Autor: Paola Alexandra Tirira Aldaz

*Universidad Técnica del Norte

Correo: patiriraa@utn.edu.ec

RESUMEN

En el control de *Dione juno* (Bates) se utiliza un gran porcentaje de productos químicos, para reducir pérdidas productivas provocadas por el insecto. El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de *Beauveria* sp. como agente de control biológico de *D. juno* B. en *Passiflora ligularis* (Juss) Se evaluó el insecto *D. juno* con el fin de describir los estadios larvarios, el estudio indicó un 24% de eclosión en 7 días promedio, conformado por cinco estadios larvarios con una duración de 65 días para el ciclo de vida. Para el estudio se implementó un diseño de bloques completos al azar con parcelas divididas, y las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación, crecimiento radial y patogenicidad. La infección fue realizada mediante dos formas de aplicación contacto con 1 ml de 10^6 conidios/ml sobre el insecto e ingestión en discos de 3cm de hoja de granadilla infectadas con el hongo. Para la variable porcentaje de germinación *Beauveria bassiana* granja obtuvo el 80% de germinación, crecimiento radial atribuye un crecimiento ascendente del 79% durante 9 días para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. comercial, mientras que el 63% se atribuye a *Beauveria bassiana* granja, finalmente los resultados obtenidos permitieron determinar el número de insectos muertos, como resultado de la infección, evidenciándose que el mejor efecto está representado por ingestión, el cual a los 8 días alcanza el 93.06% de mortalidad, en tanto que por contacto presenta un porcentaje de mortalidad del 88.89%, los porcentajes de mortalidad, muestran que la dosis (1×10^6), elimina las larvas consideradas en la población inicial, con un porcentaje de mortalidad del 100% en días posteriores.

Palabras clave: insecto, hongo entomopatógeno, control biológico, contacto, ingestión.

***Beauveria* sp. AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF THE DEFOLIATING
WORM *Dione juno andicola* (Bates) IN *Passiflora ligularis* (Juss.) AT THE
LABORATORY LEVEL**

Author: Paola Alexandra Tirira Aldaz

*Universidad Técnica del Norte

Email: patiriraa@utn.edu.ec

ABSTRACT

In the control of *Dione juno* (Bates) a large percentage of chemical products are used, to reduce productive losses caused by the insect. The aim of this research was to evaluate the effectiveness of *Beauveria* sp. as a biological control agent of *D. juno* B. in *Passiflora ligularis* (Juss) The insect *D. juno* was evaluated in order to describe the larval stages, the study indicated a 24% hatching in 7 days on average, consisting of five larval stages with a duration of 65 days for the life cycle. For the study, a random complete block design with divided plots was implemented, and the variables evaluated were percentage of germination, radial growth and pathogenicity. The infection was carried out by two forms of application contact with 1 ml of 10^6 conidia / ml on the insect and ingestion in discs of 3cm of granadilla leaf infected with the fungus. For the variable percentage of germination *Beauveria bassiana* farm obtained 80% germination, radial growth attributes an upward growth of 79% for 9 days for *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. commercial, while 63% is attributed to *Beauveria bassiana* farm, finally the results obtained allowed to determine the number of dead insects, as a result of infection, evidencing that the best effect is represented by ingestion, which at 8 days reaches 93.06% mortality, while by contact presents a mortality percentage of 88.89%, the mortality percentages show that the dose (1×10^6), eliminates the larvae considered in the initial population, with a mortality percentage of 100% in subsequent days.

Keywords: insect, entomopathogenic fungus, biological control, contact, ingestión.

CAPITULO I INTRODUCCIÓN

1.1.ANTECEDENTES

La producción de granadilla en la provincia de Imbabura presentó un aumento de superficie del 80% en los últimos 10 años, con un rendimiento promedio de 15 500 kg/ha/año, sin embargo una de las plagas importantes de este cultivo es *Dione juno andicola* (Bates) que ocasiona pérdidas económicas (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2018).

Las larvas de *D. juno* se alimentan de plantas de la familia Passifloraceae, es conocido como “gusano defoliador”, el cual eclosiona y empupa de manera sincronizada, sobre la planta, tutores y estructuras de soporte por su hábito gregario y se pueden encontrar grupos de hasta 100 larvas sobre el haz de las hojas (Sánchez y Rivas,2007). Representando un riesgo para el cultivo si no se toman las medidas de manejo y control oportunas, es por ello que en la última década se ha hecho énfasis en el uso de pesticidas químicos.

La tendencia mundial en favor del medio ambiente en la agricultura busca alternativas para reemplazar los agroquímicos dentro de un programa de manejo integrado de plagas,por lo tanto, se considera a los biocontroladores como son los hongos entomopatógenos, para disminuir el daño producido al agroecosistemam (MAG, 2018).

Según García et al (2008), “Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos y entre los más importantes están los géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutellam* *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*” (p.25). Los hongos entomopatógenos se encuentran en las divisiones Myxomycota, Eucomycota y Ascomycota , por su gran potencial para ser empleados como biocontroladores, constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas agrícolas (Cañedo y Ames,2008).Los hongos presentan un mecanismo de acción denominado micosis y tiene como función producir micotoxinas como lo es

Beauveria bassiana(Bals.) Vuill. una especie que está asociada al control de lepidópteros y coleópteros.

Monzon (2001) afirma que *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Moniliaceae. Se ha informado que debido a su mecanismo de acción ataca a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola, entre las más importantes están *Hypothenemus hampei* Ferrari, *Plutella xylostella* L. y *Cosmopolites sordidus* Germar, ya que tiene la capacidad de producir de forma rápida conidias infecciosas. Entre los diferentes estudios realizados en América Latina destacan:

Gandarilla-Pacheco et al. (2018) realizaron la caracterización de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con la finalidad de determinar la patogenicidad en el tercer estadio con dos cepas en lepidópteros y coleópteros, debido a una alta actividad entomopatógena se presentó una mortalidad del 73% y el 74% a los 55 días después de la infección, las cepas produjeron una mortalidad significativa mayor en adultos y ninfas, por lo tanto asumen que los resultados pueden variar de acuerdo a los ecosistemas de donde provengan las cepas.

Malpartida- Zeballo et al. (2013) plantean que la patogenicidad del hongo *B. bassiana* (Bals.) Vuill., como agente de control biológico potencial en larvas de tercer estadio del “defoliador del maracuyá” *Dione juno andicola* (Bates) (Lepidoptera: Nymphalidae). Esta investigación demostró una mortalidad, entre 20 y 84% al cuarto día. Por lo que concluyeron que la cepa de *B. bassiana* (Bals.)Vuill. tiene un gran potencial como controlador biológico.

Monzon (2001) indica que *B. bassiana* (Bals.)Vuill. tiene la capacidad de infestar a temperaturas bajas de 2°C, concluyendo que actúa de forma significativa a temperaturas de 15 a 20°C con una óptima de 25°C, posee una alta eficacia en humedades relativas del 51 al 100%, considerando que es una cepa muy virulenta al poseer esas características en T² y HR con respecto a otras cepas de hongos entomopatógenos como *Paratoxotus farinosus* (Fairmaire) y *Metarhizium anisopliae* (Metsh.), finalmente el entomopatógeno tiene mayor efectividad en insectos adultos, con elevadas concentraciones como 1.4 x 10⁶ presentando una mortalidad del 97%.

1.2.PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC,2020) indica que en el Ecuador se siembran 5 200 000 ha de las cuales 1 191 131 hectáreas son tratadas con plaguicidas, como resultado el 66% al 100% de productores usan estas sustancias. El 44.3% de la superficie agrícola usa plaguicidas de forma rutinaria y preventiva, en el cual solo 3 de cada 10 hectáreas son tratadas por técnicos especializados es decir el 9.9%.

El 97% y 99% de los productos químicos aplicados no desarrollan su modo de acción en los organismos que se desean combatir, es decir el porcentaje de los químicos aplicados que alcanzan las plagas es menor al 0.1% y como consecuencia se distribuye en el ambiente, provocando contaminación de diversos sustratos, destrucción de hábitats silvestres, efectos tóxicos sobre animales domésticos, reducción de los sistemas de producción y pérdida de la biodiversidad de los agroecosistemas (Torres y Capote, 2004).

MAG (2018), afirma que el incremento de pesticidas en la provincia de Imbabura se atribuye a que el cultivo de granadilla ha aumentado su número de hectáreas desde el 2010, actualmente se reporta un aproximado de 1000 hectáreas en Imbabura, y a consecuencia de este incremento se ha acrecentado el uso de plaguicidas. Los insecticidas representan el 27% del total de plaguicidas importados en años recientes en Ecuador, los mismos que se encuentran consolidados en categorías toxicológicas, sin embargo su mal uso en la anterior década provocó el 53% de intoxicaciones humanas.

Según Malpartida-Zeballos et al., (2013) una de las plagas que caracterizan al cultivo de *Passiflora* sp. es *Dione juno* (Bates) un insecto que en sus cinco estadios larvales se alimenta de las hojas causando defoliación y daño a los botones florales, disminuyendo la producción hasta en un 42%.

1.3.JUSTIFICACIÓN

El productor desconoce el diseño de un proceso biológico, asociado a estrategias de manejo integrado de plagas, mediante el uso de hongos entomopatógenos (MAG,2018). Los microorganismos patógenos son inofensivos para el hombre, los animales y plantas, como lo es *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.el cual fue descrito hace 170 años y es considerado como un hongo que debe ser utilizado para el control de insectos plaga (Mota Delgado,2011).

La aplicación de biocontroladores como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., poseen una mayor efectividad en insectos adultos en el IV y V instar, con elevadas concentraciones como 1.4×10^6 presenta una mortalidad del 97% e intentará sustituir el uso de insecticidas químicos en el desarrollo de *Passiflora ligularis* Juss (Malpartida- Zevallos et al.,2013). Entre 1888 y 1896 en uno de los primeros intentos por controlar parásitos plaga, se estableció una estación experimental con el objetivo de producir *B. bassiana* (Bals.) Vuill, siendo favorables los primeros reportes, sin embargo, la incidencia natural de la enfermedad fue frecuente y efectiva reduciendo la población (Hernández y Berlanga, 1999).

Los problemas de seguridad alimentaria han visto la necesidad de implementar alternativas en el manejo integrado de plagas y enfermedades, que permitan la preservación de los recursos naturales, mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas. De esta manera surge el interés por la aplicación de biocontroladores de alta efectividad, mediante el uso de hongos entomopatógenos, los cuales representan una alternativa amigable con el medio ambiente y la producción vegetal (MAG, 2018).

Algunos insectos plagas de importancia agrícola y económica, producen bajos rendimientos afectando la calidad de un cultivo; sin embargo, esta investigación permitirá evaluar el comportamiento de *Dione june* (Bates) frente a la aplicación de un organismo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ,en donde se observará la asociación parasitaria con el microorganismo llevando a la muerte a la larva, bajo condiciones controladas.

1.4.OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de *Beauveria* sp. como agente de control biológico de la larva defoliadora *Dione juno* (Bates) en *Passiflora ligularis* (Juss).

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente las cepas en estudio de *Beauveria* sp. en laboratorio, a través de mediciones de crecimiento radial y porcentaje de germinación.
- Determinar la patogenicidad de las cepas en estudio de *Beauveria* sp. en larvas de *Dione juno* (Bates), bajo condiciones controladas en laboratorio.

1.5.HIPÓTESIS

1.5.1. Hipótesis nula

La forma de aplicación de *Beauveria* sp. no influye en el biocontrol de *Dione juno* (Bates).

1.5.2. Hipótesis alternativa

Al menos una de las formas de aplicación de *Beauveria* sp. resulta eficiente en el biocontrol de *Dione juno* (Bates).

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Pasifloras

Las pasifloráceas se constituyen como una familia botánicamente reconocible, presentan características de plantas trepadoras con una llamativa corona floral, ubicada entre el perianto y el androceo. El género *Passiflora* comprende varias especies andinas importantes para los mercados nacionales, regionales e internacionales. Delascio-Chitty (2006) menciona que este grupo de plantas se ubica dentro de la clase Magnoliopsida, subclase Dilleniidae, orden Violales, Passifloriales, tiene su mayor diversidad y representación en Latinoamérica, conformada por 18 géneros y alrededor de 700 especies, distribuidas en los trópicos y regiones cálidas.

Debido a la demanda ya sea como fruta fresca o alimento procesado destaca la especie *Passiflora ligularis* Juss. que es considerada originaria de América tropical, extendiéndose desde México hasta Suramérica y se cultiva en diferentes condiciones agroecológicas que inciden en la producción (Miranda et al., 2009).

2.1.1. *Passiflora ligularis* Juss.

Es una planta perenne, de hábito trepador y de rápido crecimiento, posee un tallo semileñoso en el cuello de la planta y herbáceo en el resto. El sistema radical de la granadilla es superficial debido a que el 50 al 60% de las raíces se localizan a profundidades de 35 cm y que más del 60% de las raíces se localizan en un radio de 150 cm alrededor de la base del cuello de la planta, finalmente las hojas son de forma acorazonada, verde intenso, alternas y con nervaduras bien definidas en el envés, con un tamaño de 10 a 25 cm de largo y un ancho de 10 a 15 cm (Cerdas y Castro, 2003).

2.1.1.1. Clasificación taxonómica

Según Rivera et al. (2002) Passifloraceae Juss. posee entre 17 a 25 géneros, dentro de los cuales *Passiflora* L. resulta ser el más numeroso e importante económicamente, este género agrupa aproximadamente 575 especies dentro de las que encontramos a la granadilla cuya clasificación taxonómica es:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Fabidae
- Orden: Malvales
- Familia: Passifloraceae
- Género: *Passiflora*
- Especie: *P. ligularis* Juss, 1805

De acuerdo al Diagnóstico Rural realizado con intervención del Ministerio de Agricultura y Ganadería y productores de granadilla, MAG (2018) plantea que en la provincia de Imbabura esta especie presenta un aumento de uso en hectáreas, debido a sus condiciones climáticas ideales (Tabla 1), considerando que la zona de mayor influencia se encuentra en el Valle de Intag, en la parroquia de Cuellaje con un área destinada al cultivo de 500 hectáreas, con un rendimiento promedio de 14725 toneladas de producción al año en la provincia. Esta producción ha tomado importancia en la zona norte del Ecuador, sin embargo, no existe información sobre el manejo nutricional, ya que la calidad de la fruta, ha sido afectada por la alta demanda de nitrógeno y potasio provocando problemas como bajos rendimientos (Gaona-Gonzaga et al., 2020).

Tabla 1*Factores climáticos ideales para el cultivo de granadilla*

Factor	Rango
Altura	1500 – 2200 m.s.n.m
Temperatura	16-24°C
Humedad relativa	75-85%
Precipitación mínima anual	1500 mm
Vientos	Moderados
Horas luz	5-7 diarias
Ph	5.5 – 6.5
Suelos	Franco-arenosos, bien drenados, buena aireación y alto contenido de materia orgánica

Fuente: Cerdas y Castro, (2003)

2.1.2. Plaga de granadilla *Dione juno andicola* (Bates)

Dione juno Andicola (Bates), una de las plagas más destacadas en el cultivo de granadilla, es una especie perteneciente a la subfamilia Heliconiinae (Nymphalidae) con la función de ser holometábolo, es decir un insecto con metamorfosis completa, presentando variaciones en su ciclo de vida y desarrollo ya que puede ser influenciado por factores como temperatura, humedad, altitud, latitud y disponibilidad de alimento (Sánchez et al., 2016).

Dione juno (Bates) se caracteriza porque ambos sexos presentan una coloración naranja con bordes negros en la región dorsal y manchas plateadas en la región ventral. A pesar de ser una especie monomórfica, la genitalia permite identificar una hembra de un macho, en donde la hembra presenta un abdomen abultado. Cada estadio se caracteriza por las características morfológicas y tamaño, encontrando diferencias en la duración total del ciclo de vida, siendo el valor mínimo de 38 días y máximo 71 días (Sánchez et al., 2016).

1.1.2.1. Clasificación de los estadios en *D. juno* (Bates)

El ciclo biológico del Gusano defoliador (*Dione juno* (Bates)) presenta una metamorfosis completa. El ciclo de vida comprende cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto (Tabla 2).

Tabla 2

Medidas en milímetros y días de duración de D. juno andicola (Bates)

Estadios biológicos	Número Individuos	Color	Longitud (mm)	Días promedio
Huevo	500	Amarillo claro	1	6
Estadio larval				
I		Café oscuro	3.75	4
II		Café oscuro	13.5	4
III		Café oscuro	22	4
IV		Café oscuro	35	4
V		Café oscuro	55	4
Pre-crisálida		Café oscuro	58	1
Crisálida		Café claro	25	11
Total				38
Adulto Masculino		Naranja y negro	75	12
Adulto Femenino		Naranja y negro	82	8

Fuente: Cient (2019)

a) **Huevo**

La oviposición es de 50 huevos aproximadamente por hembra adulta madura, posee una morfología externa con estructuras como las quillas ventrales y horizontales, estas estructuras permiten un mayor soporte al huevo debido a que están altamente calcificadas dando una mayor dureza y protección al cigoto en desarrollo, la oviposición del huevo

interactúa por medio de los microporos respiratorios llamados aeropilos, los mismos que permiten el intercambio de gases con el ambiente (Figura 1) (Sánchez et al., 2016).

Figura 1
Estadio del huevo



b) Estadio larval

D. juno (Bates) luego de eclosionar alcanza una longitud de 2 mm y presenta desarrollo de estructuras principales en el aparato bucal, tipo masticador con estructuras importantes como el pezón hilador y los palpos maxilares, los cuales son órganos táctiles y prensiles (Figura 2). La cápsula cefálica está compuesta por dos lóbulos frontales lisos de color negro con ornamentaciones a manera de cuernos; posterior a la cápsula cefálica, el cuerpo de la larva se divide en tres regiones generales, el tórax, el abdomen y la región anal (Sánchez et al., 2016). La larva presenta diferente tipo de coloración de acuerdo al instar alcanzado en el primer instar se caracteriza por poseer un color verde claro, y conforme crece empieza a tomar coloraciones cafés oscura con pequeñas manchas amarillas y rojas.

Figura 2
Larva en primer instar



Alcanzan el quinto instar tienen en promedio 49 mm (Figura 3). La coloración tiene un cambio significativo durante todos los instar, ya que el primer instar se caracteriza por poseer un color verde claro, y conforme crece empieza a tomar coloraciones cafés oscura con pequeñas manchas amarillas y rojas. Las estructuras principales de este estadio es un aparato bucal de tipo succionador probóscide, aparición y número de escudos, los cuales

están presentes desde el segundo instar, siendo el quinto el cual tiene mayor cantidad de ellos y totalmente desarrollados, el cuerpo de la larva se divide en tres regiones generales, el tórax, el abdomen.

Figura 3
Larva en quinto instar



c) Estadio de pupa o crisálida

D. juno (Bates) en el estadio de pupa forma una cutícula esclerotizada para dar protección a la zona cefálica. Según Sánchez et al. (2016), “Inicialmente es de color café claro y conforme pasan los días va tomando una coloración oscura en la etapa de pre-crisálida el individuo llega a medir cerca de 41 mm, empieza a enrollarse en sí mismo” (p.10). (Figura 4).

Figura 4
Pupa

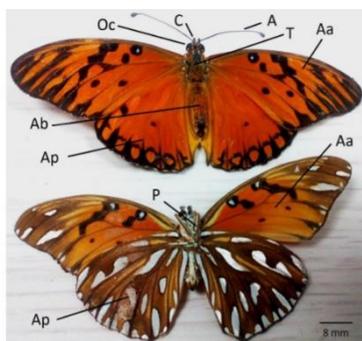


d) Estadio adulto

En este estadio los individuos considerados lepidópteros, alcanzan una longitud de 76 mm. En vista dorsal, presenta una coloración naranja con líneas negras y en la región ventral naranja con líneas negras, el ala anterior y en la posterior café con líneas plateadas,

con un aparato bucal denominado espiritrompa o probóscide (Sánchez et al. 2016) (Figura 5).

Figura 5
Estadio adulto



Nota: La figura indica el Estadio adulto. Morfología externa: ocelos (Oc), cabeza (C), antena (A) tórax (T), abdomen (Ab), a la anterior (Aa), ala posterior (Ap), patas (P). Fuente: Sánchez et al. (2016).

2.2. Manejo integrado de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es una estrategia que tiene como objetivo controlar las plagas, enfermedades y malezas que afectan la agricultura, con un enfoque sustentable. Está compuesto por un conjunto de herramientas y prácticas culturales, biológicas y químicas socialmente aceptadas, minimizando el impacto económico y ambiental. El MIP incluye el uso responsable de productos agroquímicos y productos biotecnológicos (Ripa y Larral, 2008).

2.2.1. Control químico

Los insecticidas constituyen recursos de primera importancia contra las plagas, por sus efectos rápidos. El control químico de las plagas es la represión de sus poblaciones o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias artificiales. Según los compuestos sintéticos que se utilizan en la protección de los cultivos reciben el nombre genérico de pesticidas o plaguicidas (Cisneros, 2005).

Se considera que su utilización, conjuntamente con la de otros pesticidas, ha jugado un rol importante en el incremento de la productividad agrícola de las últimas décadas, sobre todo en los países más tecnificados.

Según Malpartida-Zeballos et al. (2013), en el control químico de *D. juno* (Bates), se aplica Malathion 57% (400cc/cilindro de agua) el cual es considerado un insecticida

práctico en la eliminación de la plaga, sin embargo actualmente el productor es capacitado en el uso de químicos por parte de la industria agrícola como el único método de control, sin tener en cuenta que afecta seriamente a los polinizadores y con ello la producción de frutos.

2.2.2. Control biológico

El control biológico es considerado una de las tres herramientas importantes para la prevención de enfermedades debidas a agentes tóxicos en el medio ambiente (Lauwerys, 2001). El biocontrol, se considera una de las técnicas preferibles a aplicar en el control de plagas, se denomina lucha microbiológica si se utilizan microorganismos entomopatógenos como virus, bacterias, hongos y nematodos.

Un sistema de control apropiado para la reducción de la incidencia de plagas en el sector agrícola es el Manejo Integrado de Plagas, dentro del control biológico de *Dione juno* (Bates) se recomienda emplear *Bacillus thuringiensis* (Shigetane-Ishiwata), pero no se indica especies de hongos entomopatógenos. Sin embargo los microorganismos patógenos causan síntomas en el hospedero *Dione juno* (Bates) como pérdida de sensibilidad, falta de coordinación, letargo, inapetencia melanización y parálisis, finalmente con la muerte del insecto se incrementa la esporulación y dispersión del hongo, lo cual permite un control más allá de la aplicación (Malpartida- Zevallos et al.2013).

2.2.2.1. Virus

Los virus entomopatógenos son entidades patogénicas intracelulares, que tienen como mecanismo de acción infectar células vivas y alterar el desarrollo del hospedero, sobreviven dentro de un organismo vivo. Los virus atacan principalmente a larvas desarrollando síntomas como el de que sus cuerpos se vuelven suaves y flácidos antes de morir y generan un líquido blanco que proviene de la parte interior (Durán Ramírez, 2007).

El principal componente de los virus es un ácido nucleico que puede ser ADN o ARN ambos de cadena doble o sencilla. Badii y Abreu (2006) plantean que las familias de virus más comunes son Baculoviridae (Virus de la poliedrosis nuclear, Reoviridae (virus de la poliedrosis citoplasmática) y Poxviridae (virus entomopox). De los virus entomopatógenos, los baculovirus (VPN) son los más utilizados con fines de control biológico, debido a que

tienen un rango de hospedantes limitado a algunas especies de lepidópteros, himenópteros, dípteros, coleópteros y tricópteros (Tabla 3).

Tabla 3

Familias de virus entomopatógenos

Familia	Género	Ácido nucleico	Forma de la partícula	Cuerpo de inclusión	Huéspedes
Baculoviridae	<i>Baculovirus</i>	ADN	Varilla	SI	Neuroptera, Díptera, Trichoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera y Acari. No vertebrados ni plantas.
Poxviridae	<i>Entomopoxi virus</i>	ADN	Ovoide	SI	Lepidoptera, Díptera, Orthoptera, Coleoptera, Vertebrados, no plantas.
Reoviridae	<i>Cypovirus</i>	ARN	Icosaedro	SI	Lepidoptera y Díptera. Vertebrados y plantas.

Fuente: Badii y Abreu (2006).

2.2.2.2. Bacterias

Morales (2003), indica que las bacterias entomopatógenas forman parte de la familia Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae y Bacillaceae. Considerados organismos microscópicos unicelulares, que tienen como alimentación la materia orgánica,

algunas de ellas deben permanecer en contacto para sobrevivir debido a que pueden multiplicarse en el intestino del hospedero, producen toxinas para luego invadir el hemocele, mientras que otras si pueden persistir fuera de ellos, sin embargo los insectos que se encuentran afectados por bacilos tiene síntomas como letargo, una alimentación lenta y en su muerte adoptan un color grisáceo produciendo un olor putrefacto.

Hasta el momento se conocen 3 especies de bacterias con posibilidad de ejercer control sobre insectos. *Bacillus thuringiensis* Berliner, *Bacillus sphaericus* Ahmed et al. y *Bacillus popilliae* Dutky. Estas bacterias han sido encontradas colonizando insectos de los órdenes Diptera, Ortoptera, Hymenoptera y Coleoptera. Se destaca el empleo de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de larvas de lepidópteros que atacan a plantas agrícolas y forestales. Las bacterias son organismos procarióticos que tiene una transmisión que es horizontal y el hospedero las adquiere por ingestión (Badii y Abreu, 2006).

2.2.2.3. Hongos entomopatógenos

Organismos multicelulares, que se componen de finas estructuras denominadas hifas, las cuales tienen como objetivo formar una masa intrincada denominada micelio, la misma que crece dentro o a través del hospedero (Durán Ramírez, 2007). Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen como agente causal un hongo. Badii y Abreu (2006) mencionan que dentro de los principales hongos entomopatógenos existen varias especies de las clases Hyphomycetes (*Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Verticillium* sp. y *Penicillium* sp.), Zygomycetes (*Entomophthora* sp., *Erynia* sp., *Entomophaga* sp.), Oomycetes (*Pythium* sp. y *Tarichium* sp.) (Tabla 4).

Correal et al. (2018) menciona que los hongos entomopatógenos juegan un papel muy importante como agentes de control de muchas especies de artrópodos al comportarse de forma epizootica, que ocasiona la reducción de poblaciones naturales. La infección natural comienza cuando el insecto entra en contacto con el hongo al transitar por sustratos que este ha colonizado, como en el caso del suelo, el agua o las partes aéreas de las plantas.

Tabla 4

Principales hongos entomopatógenos utilizados comercialmente para el control de insectos plaga

Especie	Insecto plaga
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	Langostas, chapulines, áfidos, escarabajos, mosquita blanca
<i>Beauveria brogniartii</i> (Sacc.)	Moscas, escarabajos
<i>Langenedium giganteum</i> (Couch)	Mosquitos
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.)	Termitas, chapulines, gallina ciega, langostas, picudos del chile y algodón, escarabajos
<i>Paecilomyces fimosoroseus</i> (Wize) Brown y Smith	Mosquita blanca
<i>Lecanicillium</i> (Zimm.)	Áfidos, trips, mosquita blanca

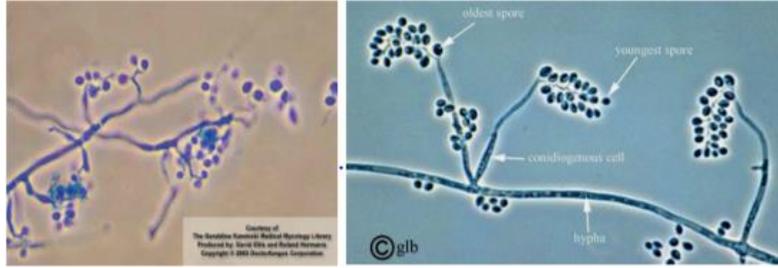
Fuente: Borges et al (2010).

2.3. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

2.3.1. Morfología

Es un entomopatógeno imperfecto con hifas septadas y estructuras reproductivas denominadas conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro de donde nacen las esporas en forma ovalada de 2 a 3 micras de diámetro, las mismas que se insertan en el raquis (Figura 6). La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 30°C y humedad relativa superior a 90%. El hongo se introduce al insecto mediante penetración del integumento con actividad enzimática, sobre las cuales se desarrolla conidios (Morales, 2003).

Figura 6
Micelio Beauveria bassiana



Fuente: Chiriboga et al. (2015).

2.3.2. Taxonomía

Flórez et al. (2005) indican que la taxonomía de este hongo es la siguiente:

- Reino: Fungi
- División: Ascomycota
- Clase: Sordariomycetes
- Subclase: Hypomycetes
- Orden: Hypocreales
- Familia: Clavicipitaceae
- Género: *Beauveria*
- Especie: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

2.3.3. Modo de acción

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. es un hongo con un amplio espectro de acción que ataca a los insectos en fase de huevecillo, larva, pupa e imago, debido a que son susceptibles a la micosis del hongo entomopatógeno. Su modo de acción lo ejerce sobre insectos como dípteros, coleópteros, lepidópteros, hemípteros, homópteros y algunas plagas del suelo (Figura 7). El hongo puede germinar, penetrar la cutícula e invadir el hemocele y causar la muerte de los insectos, lo cual sugiere que las condiciones necesarias para la germinación de las conidias y el crecimiento hifal están presentes en el integumento del insecto susceptible

y se puede encontrar en forma natural sobre larvas y crisálidas de un insecto plaga de un cultivo en particular (Suarez, 2009).

Figura 7
Larvas infectadas



Fuente: Malpartida-Zevallos et al. (2013).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción de la ubicación geográfica del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en La Granja Experimental “La Pradera” perteneciente a la Universidad Técnica del Norte; la cual se encuentra en latitud Norte 0°21’19” y longitud Oeste 78°11’32” en la parroquia de San José de Chaltura perteneciente al cantón Antonio Ante de la provincia de Imbabura a una altitud de 2340 m.s.n.m y con una temperatura promedio de 16 °C. En la Figura 8 se puede observar el mapa base de San José de Chaltura, perteneciente al cantón Antonio Ante de la Provincia de Imbabura, lugar asignado para la investigación científica en laboratorio.

3.2. Materiales, equipos, insumos y herramientas

El control biológico de *Dione juno* (Bates) se evaluó con la patogenicidad del hongo entomopatógeno *Beauveria* sp. como biocontrolador, el ensayo se realizó en condiciones controladas de laboratorio en la Granja experimental la Pradera para lo cual se ocupó los siguientes materiales (Tabla 5).

3.3. Métodos

El diseño que se implementó es de bloques completamente al azar con parcelas divididas y se tomó en cuenta dos factores:

3.3.1. Factores de estudio

3.3.1.1. Factor A: Hongo entomopatógeno

A1: *Beauveria* sp. Granja La Pradera

A2: *Beauveria* sp. Comercial

3.3.1.2. Factor B: Formas de aplicación

B1: Contacto

B2: Ingestión

B3: Agua destilada (Testigo)

Figura 8
 Mapa base San José de Chaltura

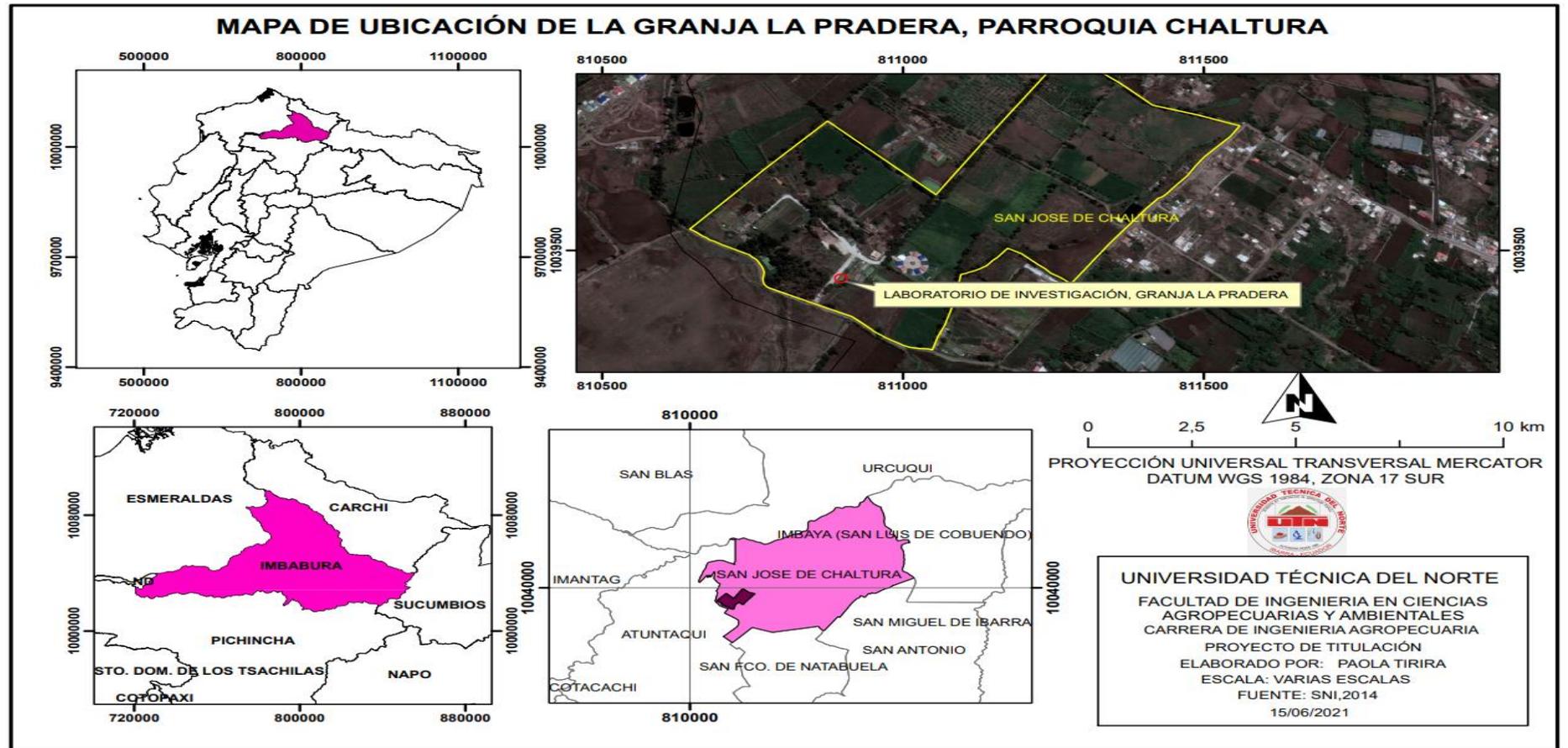


Tabla 5*Materiales, equipos, insumos y herramientas*

Materiales	Equipos	Insumos	Herramientas
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Beauveria</i> sp. • <i>Dione juno</i> • Cajas petrí 50 ml • Tubos de ensayo • Gradilla • Probeta • Guantes quirúrgicos • Cubre bocas • Cofia • Porta y cubre objetos • Mechero de gas • Tanque de gas • Papel toalla estéril • Papel aluminio • Papel filtro • Libro de campo 	<ul style="list-style-type: none"> • Higrómetro • Incubadora • Cámara de flujo • Microscopio • Impresora • Computadora • Micropipeta 	<ul style="list-style-type: none"> • Agar Papa Dextrosa (PDA) • Gentamicina • Hipoclorito de sodio al 0.5% • Alcohol etílico al 70% • Tween al 0.1% • Azul de lactofenol • Agua destilada • Amonio cuaternario 0.5% 	<ul style="list-style-type: none"> • Bisturí • Aguja de disección • Espátula de Drigalski • Pinzas

Los factores de aplicación son por contacto e ingestión usando el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, es decir el factor B1 fue aplicado directamente a la larva mientras que el factor B2 fue aplicado en las hojas de alimento y en el B3 sin forma de aplicación, sólo se usó agua destilada.

3.3.2. Tratamientos

Los tratamientos obtenidos a partir de los factores de estudio se detallan en la (Tabla 6).

Tabla 6

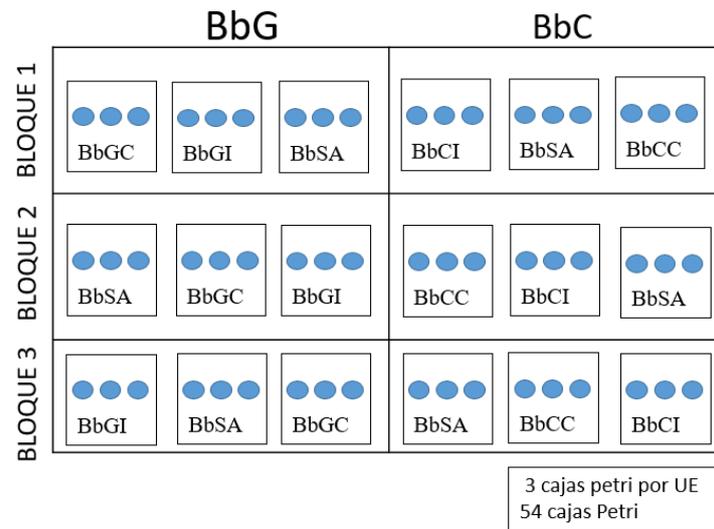
Tratamientos del Experimento

Tratamiento	Hongo entomopatógeno	Formas de aplicación	Código
T1	<i>Beauveria sp.</i> Granja La Pradera	Contacto	BbGC
T2	<i>Beauveria sp.</i> Granja La Pradera	Ingestión	BbGI
T3	Testigo	SA	BbGSA
T4	<i>Beauveria sp.</i> Comercial	Contacto	BbCC
T5	<i>Beauveria sp.</i> Comercial	Ingestión	BbCI
T6	Testigo	SA	BbCSA

3.3.3. Diseño experimental

Se implementó un diseño por bloques completos al azar con parcelas divididas (DBCA con PD) con 3 bloques, donde cada bloque constó de 1 biocontrolador con 2 formas de aplicación, lo cual dió un total de 18 unidades experimentales (Figura 9). Cada unidad experimental comprende 3 cajas Petri de cada tratamiento lo cual dió un total de 18 cajas Petri por bloque, y en total de 54 cajas Petri en los 3 bloques. La parcela principal consta del hongo entomopatógeno y las formas de aplicación se establecieron en la subparcela.

Figura 9
Distribución de las parcelas experimentales



Características del experimento

- Número de hongos entomopatógenos 2
- Número de formas de aplicación 3
- Bloques 3
- Total de tratamientos 6
- Número de unidades experimentales 18
- Total de cajas Petri 54

3.3.4. Características de la unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por tres cajas Petri (Tabla 7), con sus dos formas de aplicación mediante contacto e ingestión con *Beauveria* sp. en medio PDA, en una dosis de 5 ml por caja Petri, pasó por fases de adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, para su completa acción entomopatógena en *Dione juno* (Bates).

Tabla 7*Características de la Unidad Experimental*

Datos	Medidas
Densidad de la caja Petri	90 mm x 14 mm
Descripción de la caja Petri	Vidrio
Humedad del medio	60% al 70%
pH	6.8 - 7
Distancia entre cajas Petri	5 cm
Distancia entre unidad experimental	20 cm
Números de insectos por caja Petri	4

En la Tabla 8 se presenta el número de hongo entomopatógeno usado en cada unidad experimental y la descripción de los bloques con la interacción hongo y aplicación, para reducir el error y controlar la varianza del error experimental, permitiendo tener una mayor precisión en el ensayo.

3.3.5. Análisis estadístico

La Tabla 8 presenta el esquema del análisis de varianza de un diseño de Bloques Completos al azar con parcelas divididas.

Para la variable porcentaje de germinación, se realizó un análisis T para muestras independientes debido a que se comparó las medias de un hongo entomopatógeno comercial y uno obtenido en la Granja la Pradera, mientras que para la variable crecimiento radial se realizó un análisis de varianza y una prueba de Fisher al 5%, para la variable no paramétrica patogenicidad se efectuó una prueba de Friedman debido a que no cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad. Para el análisis de los datos obtenidos se usó el paquete estadístico InfoStat versión 2018.

Tabla 8

Esquema de varianza en Diseño de Bloques Completos al Azar con parcelas divididas (DBCA con PD)

Fuentes de Variación	GL
Bloque	2
Hongos entomopatógenos	1
Modo de aplicación	1
Bloque X Hongo entomopatógeno	2
Bloque X Modo de aplicación	2
Hongo entomopatógeno X Modo de aplicación	1
Error	8
Total	17

3.3.6. Variables a evaluar

Las variables evaluadas son crecimiento radial, porcentaje de germinación, y porcentaje de patogenicidad usando el gusano defoliador de pasiflora *Dione juno* (Bates) en el tercer instar larvario. Según Vélez et al. (2000) estas variables son consideradas indicaciones primordiales para determinar la caracterización fisiológica de la cepa entomopatógena *Beauveria* sp.

3.3.6.1. Crecimiento radial

La caracterización fisiológica de la cepa de *Beauveria* sp. se determinó con el crecimiento radial, sembrando 10 μ l de la concentración 1×10^6 de conidias ml^{-1} en el centro de las placas Petri con medio PDA sin aplicación de gentamicina, las mismas que se mantuvieron en cámara de incubación a 22.6°C , durante 9 días y revisiones cada 3 días. Se usó papel milimetrado con el cual se midió, de forma diaria, a partir del segundo día de siembra, el crecimiento diametral sobre la longitud de dos diámetros perpendicular y promediando las dos mediciones (Rodríguez y Lecuona, 2002).

Figura 10
Crecimiento radial de la cepa Beauveria bassiana



Fuente: Rodríguez y Lecuona, 2012

3.3.6.2. Porcentaje de germinación

Se sembraron 5 μ l de la concentración 1×10^6 de conidias ml^{-1} y se tomaron 5 alícuotas en medio PDA líquido con gentamicina, se colocó en incubación a una temperatura de 22.6°C por 24 horas, se aplicó sobre la alícuota azul de lactofenol para detener la germinación y permitir ver las conidias en el microscopio, seguidamente se extrajo una alícuota, se colocó en el porta objetos cubierto con un cubreobjetos y se evaluó el porcentaje de germinación, mediante la evaluación de un mínimo de 100 esporas germinadas y no germinadas por alícuota, es decir se tomó en cuenta la espora que presentó un tubo germinativo igual o mayor al diámetro de la espora.

El porcentaje de germinación se midió mediante la fórmula:

$$\%G = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ conidias germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de conidias}} \right) \times 100.$$

3.3.6.3. Patogenicidad

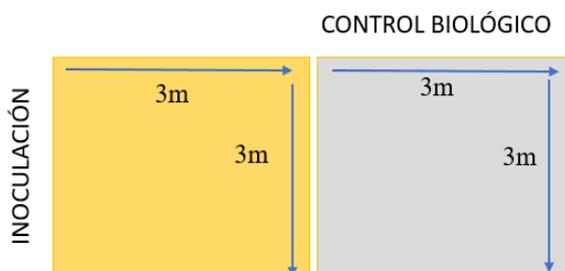
Se distribuyeron 36 larvas en el tercer instar por tratamiento y se determinó por la ausencia de movimiento de la larva al ser tocada, con un hisopo estéril, las larvas se inocularon con el hongo por dos métodos de aplicación contacto e ingestión, en una suspensión de esporas, a razón de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ en agua destilada estéril más Tween 80 al 1%. Las observaciones fueron 2 veces al día y a la misma hora por 10 días.

3.4. Manejo específico del experimento

3.4.1. Áreas de trabajo

Se implementó dos áreas, la primera para el estudio morfológico e incubación en cajas Petri de *Beauveria* sp. y el segundo para el establecimiento del diseño y evaluación de patogenicidad del hongo entomopatógeno en el insecto defoliador, por tal motivo, se adecuaron cada una de estas acorde a las condiciones ambientales requeridas por la investigación. En la Figura 11 se detallan las áreas implementadas para la investigación.

Figura 11
Dimensiones del área de investigación



3.4.2. Adquisición de materiales

Algunos de los materiales, insumos y equipos de laboratorio fueron adquiridos a través de la empresa Zambrano en la ciudad de Quevedo y MM Representaciones en la ciudad de Ibarra.

3.4.2.1. Recolección de insecto defoliador *Dione juno* (Bates)

Se realizó la recolección de *Dione juno* (Bates) en el cultivo de *Pasiflora ligularis*, Juss ubicado en la zona de Imbabura ($0^{\circ}19'49''\text{N}$; $78^{\circ}07'23''\text{W}$), para lo cual se tomó insectos de la planta en campo, el cultivo se encuentra establecido en un área de 70 metros cuadrados, sin aplicación de pesticidas para el desarrollo del insecto - plaga, la granadilla tiene una distancia de 1.50 metros entre planta, el mismo que consta de ocho plantas. La

producción del insecto defoliador se estableció en campo por las condiciones de temperatura, humedad, altitud, latitud y disponibilidad de alimento para el desarrollo del mismo, por planta se obtuvo una población de aproximadamente 40 gusanos, con un rango en medida 35mm hasta 55 mm en cada instar.

Para la recolección de *Dione juno* (Bates) se observó la etología y aparición de estructuras morfológicas en donde se determinó el cuarto y quinto estadio del insecto, tomando como medición la longitud del mismo, los cuales se depositaron en frascos plásticos de 20cm x 20cm, colocando una malla plástica de 1mm de grosor en la abertura del recipiente, y fueron llevados a laboratorio, con disposición de hojas frescas de granadilla (Figura 12).

Figura 12

Recolección en campo larva Dione juno andicola (Bates)



3.4.3. *Beauveria bassiana*

El biocontrolador microbiológico de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. fue adquirido en la empresa PODAGRO, este insecticida viene sellado bajo condiciones de esterilidad, de forma líquida en un envase plástico, el mismo que pasó por el protocolo de esterilidad de laboratorio para ser inoculado en el insecto defoliador en cajas Petri. Se utilizaron aproximadamente 120 ml de *Beauveria bassiana* (Bals-Vuill) con una dosis de 5ml por caja Petri.

Figura 13
Beauveria bassiana comercial

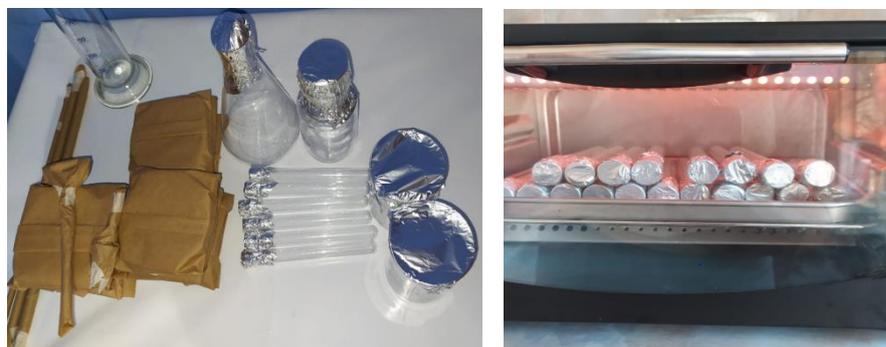


3.4.4. Protocolo de esterilidad laboratorio

Para la desinfección del medio ambiente se usó 5 ml de amonio cuaternario en 1 litro de agua, para el proceso de limpieza en la parte interior del laboratorio, al igual que se usó alcohol al 70% para la desinfección en el momento de manipulación y trabajo con el hongo.

Esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivos. La esterilización se realizó por calor húmedo con el uso de una olla de presión, a una temperatura de 111.6°C, durante 30 minutos, y calor seco con el uso de un horno a 25°C.

Figura 14
Esterilización material de vidrio



3.4.5. Proceso de purificación de la cepa

La purificación de la cepa de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. se realizó con inóculos provenientes del aislado de la etapa anterior mediante la técnica de resiembra sucesiva en el medio de cultivo PDA. Las cajas Petri fueron colocadas en incubación a

22.6°C, durante 5 días. Se realizó la técnica de obtención de esporas individuales, método que ofrece también una alternativa para purificar hongos, en donde una vez esporulado el cultivo del hongo, se realizó disoluciones y de aquella que contuvo menos cantidad de esporas, se tomó el inóculo con un asa y se realizó una la siembra y al cabo de 24 horas de incubación se observó la espora germinada al microscopio de luz blanca y se transfirió a medio PDA.

3.4.6. Desinfección y patogenicidad de la larva

Se infectó 216 insectos defoliadores *D. juno* con el hongo, para lo cual se desinfectó en hipoclorito de sodio al 0.5% y se procedió a lavar 2 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, los gusanos previamente desinfectados se infectaron con el hongo a través de dos formas de aplicación y luego se colocarán en cámara a temperatura ambiente durante un período de 10 días, por día se registró la mortalidad.

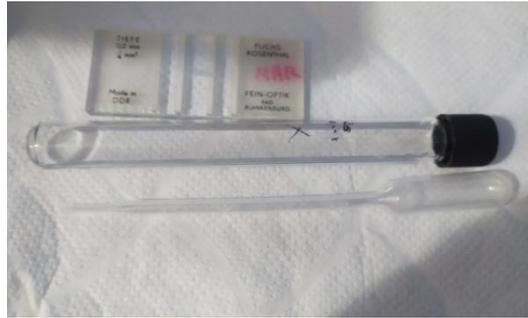
Figura 15
Desinfección *Dione juno* (Bates)



3.4.7. Determinación de concentración

Se preparó una solución de Tween 80 al 0.1% con una dilución al 10%, en donde se colocó 10 ml de Tween 80 y se agregó 90 ml de agua destilada en un recipiente de cristal, esta solución se esterilizó en olla de presión a 11.6 libras de presión durante 30 minutos, finalmente se preparó una suspensión de esporas, a partir del hongo en desarrollo. En el tubo de ensayo con 1 ml de la solución de Tween al 0.1% se colocó una pequeña porción del hongo y se agitó ligeramente para que se separen todas las esporas, por espacio de 15 segundos y se ubicó 1 ml de la solución en la cámara de Neubauer para contar el número de conidias bajo el microscopio en todas las áreas de los cuatro milímetros cuadrados de las esquinas y del centro.

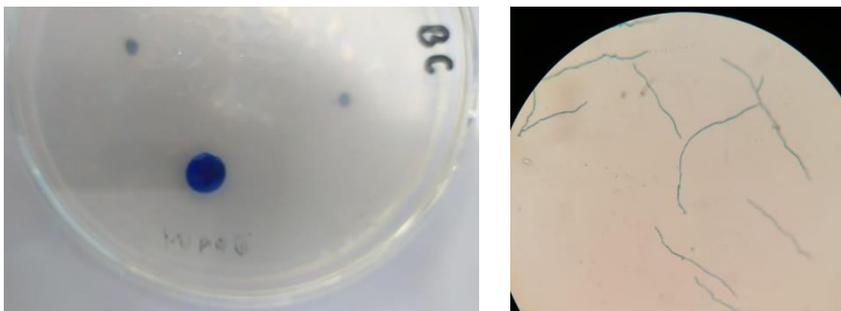
Figura 16
Determinación de concentración



3.4.8. Caracterización fisiológica de *Beauveria* sp.

En la caracterización fisiológica de la cepa *Beauveria* sp., para comprobar las propiedades de la cepa, se evaluó dos características fisiológicas: crecimiento radial y porcentaje de germinación, empleando el medio PDA sin gentamicina, en donde se sembró 10 μl de la concentración conidias mL^{-1} en el centro de placas Petri. Las 8 placas Petri se mantuvieron en incubación a 22.6°C, por 10 días, seguidamente se realizó una medición con regla milimetrada y papel milimetrado, de forma diaria. A partir del segundo día de siembra determinando el crecimiento radial, sobre la longitud de 2 diámetros perpendiculares y promediando las dos mediciones. Porcentaje de germinación, se sembró en el medio PDA con gentamicina, 5 μl de la concentración, se obtuvo 5 alícuotas y se dejó en incubación a 22.6°C por 24 horas, se añadió gotas de azul de lactofenol y se extrajo la alícuota para ser colocada en el portaobjetos y finalmente en el microscopio se observó el número de conidios germinados (Figura 17).

Figura 17
Porcentaje de germinación



3.4.9. Inoculación

La siembra se realizó en el medio de agar PDA, acidificado con 0.1% de gentamicina, para impedir el desarrollo de bacterias, para el período de incubación se esperó 15 días, donde el hongo esporuló y a continuación se extrajo masas conidiales, para ser disueltas en medio líquido con agua destilada en tubos de ensayo (Figura 18).

Figura 18
Inoculación *Beauveria bassiana*



3.4.10. Inoculación de *Beauveria* sp. en *Dione juno* (Bates)

La cepa de *Beauveria* sp. (aislamiento directo, a partir del micelio desarrollado sobre el cadáver de un grillo) y un biocontrolador de *Beauveria bassiana* comercial, se sembraron en medio PDA con gentamicina para impedir el desarrollo de bacterias, por un período de 15 días donde el hongo esporuló y se extrajo masas conidiales para realizar disoluciones seriadas y con la concentración 10×10^6 se colocó al insecto mediante dos formas de aplicación por contacto en donde el hongo entomopatógeno fue aplicado directamente al insecto *Dione juno* (Bates) y por ingestión en suspensión acuosa de conidios en agua destilada estéril se aplicó en las hojas en forma de disco de 3cm de diámetro las cuales fueron sumergidas durante 5 segundos en el medio líquido. La incubación se realizó a temperatura ambiente de 22 a 26°C durante 8 días (figura 19).

Figura 19
Patogenicidad *Dione juno* (Bates)



3.4.11. Alimentación del insecto

Como alimento, se colocó en cada placa, discos de 3cm de diámetro de hojas de granadilla de la planta hospedera, previamente lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5% y agua destilada (Figura 20). El recambio de alimento se hizo en forma diaria o antes si son totalmente consumidas. La observación fue 1 vez al día y a la misma hora.

Figura 20
Alimentación larva Dione juno (Bates)



CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ciclo de vida *Dione juno* (Bates)

Es una indicación primordial realizar la descripción de las características de los estadios (Figura 21) para determinar el ciclo de vida, se colectó 77 huevos de longitud de 1 mm, los que se mantuvieron en plantas de granadilla, presentaron aproximadamente el 24% de eclosión en 7 días en promedio, dando lugar a la larva en primer estadio, la fase larvaria I con una longitud de 1 a 5 mm durante 10 días. En la fase II se apreció una longitud desde los 7 mm hasta los 14 mm en 13 días, mientras que en la fase III una longitud de 17 mm a 23 mm durante 7 días, en el estadio IV mostró una longitud de 25 mm a 27 en 2 días y en el V instar alcanzó una longitud de 29 mm a 30 mm en 11 días. En la fase pré-crisálida, la larva mostró quiescencia, empezando a enrollarse en sí misma, hasta formar las crisálidas con un ciclo de 13 días. Los adultos alcanzaron una longitud de 50 mm a 66 mm en 7 días.

En tal sentido los resultados del ciclo de vida de esta investigación, concuerdan con la investigación de Alvites (2012) quién registró medidas de diámetro promedio de huevos de 1.0 mm para *Dione j.* (Bates) e indicó que presenta una metamorfosis completa y dividió a la segunda etapa en cinco instares, los mismos que tienen una duración entre 4 a 5 días.

Figura 21
***Dione juno* (Bates)**



En la evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en *Dione juno* (Bates) bajo condiciones controladas, se denota los siguientes resultados de acuerdo a cada variable evaluada:

4.2. Porcentaje de Germinación

El análisis T de student para muestras independientes en la variable porcentaje de germinación de los hongos entomopatógenos, indica que si existe diferencia significativa con el valor ($p=0.0475$) (Tabla 9). El rango con menor porcentaje de germinación es *Beauveria bassiana* granja debido a que las condiciones de reactivación no se ajustaron a los parámetros óptimos de laboratorio (Figura 22).

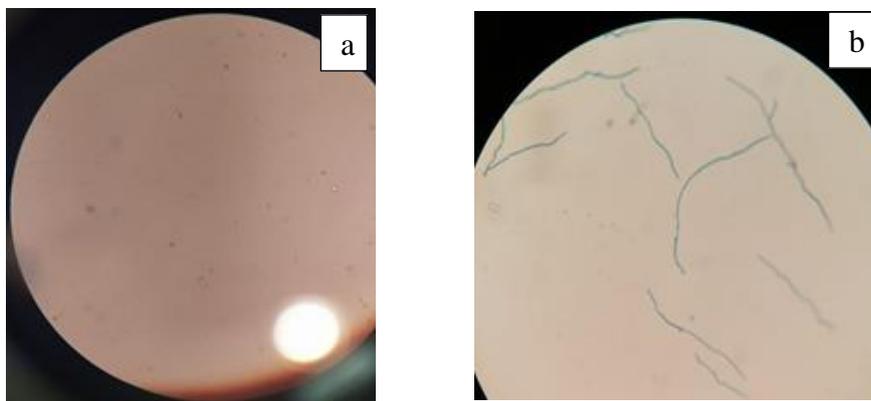
Tabla 9

Análisis T para muestras independientes porcentaje de germinación

	<i>Beauveria bassiana</i> granja	<i>Beauveria bassiana</i> comercial
	A1	A2
N	4	4
Media	80.25	85.75
Media(1)-Media(2)	-5.50	
T	-1.89	
Valor P	0.0475	

Figura 22

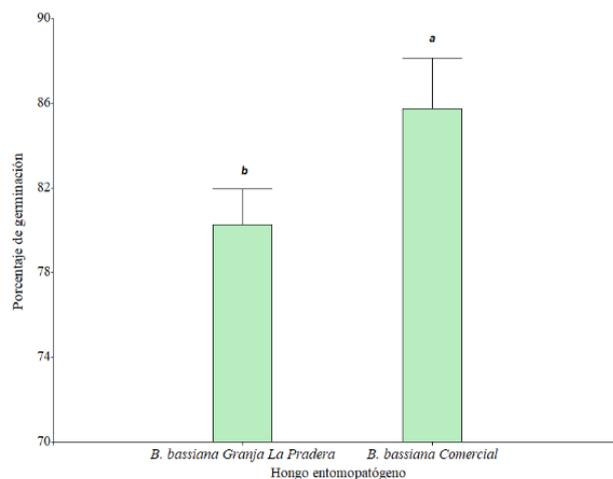
Porcentaje de germinación. a) B. bassiana granja b) B. bassiana comercial



En la figura 23, se observa el comportamiento de los aislados en donde el análisis de T determina que *Beauveria bassiana* comercial tiene una diferencia del 6% de porcentaje de germinación de esporas respecto a *Beauveria bassiana* Granja La Pradera, lo que podría referir a que este proceso se encuentra relacionado al tipo de muestra.

Figura 23

Porcentaje de germinación *Beauveria bassiana* a las 24h



Por otro lado, Díaz y Lecuona (1995) en su investigación mencionan que la producción de esporas sobre medio agarizado no siempre se relaciona, debido a que depende del aislamiento y su interacción con el medio de cultivo en el que se desarrolle. El porcentaje de germinación para ser usado como controlador biológico no debe ser menor al 80% a las primeras 24 horas, coincidiendo con el valor de los ejemplares observados en la presente investigación. Es por ello que la variabilidad intraespecífica de las cepas define su comportamiento productivo, ahora bien, esta es la causa por la cual *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. granja presenta diferencias en la producción de esporas.

Chiriboga et al. (2015) en su investigación encontraron que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. En este sentido esta investigación de acuerdo a las condiciones en que se desarrollaron las evaluaciones germinativas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. comercial se encuentra dentro del valor de germinación con un 85.75% después de 24 horas.

4.3. Crecimiento radial

En la Tabla 10 se puede observar que existe interacción entre día: cepa, independientemente del hongo entomopatógeno ($F=3.48$; $gl=3,21$; $p=0.0339$).

Tabla 10

Análisis de Crecimiento radial Beauveria bassiana

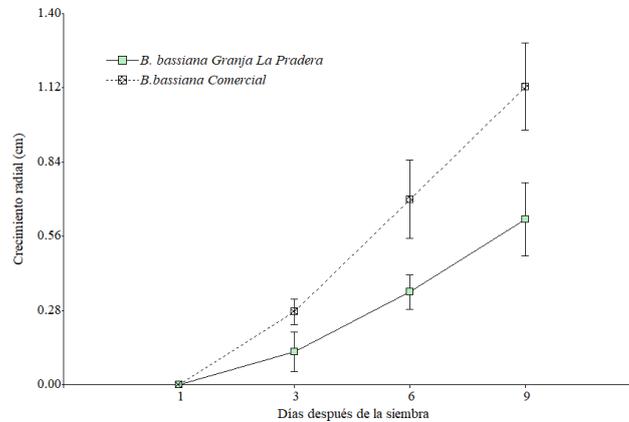
Fuente de variación	Gl T	Gl E	Valor F	Valor P
Día	3	21	42.42	<0.0001
Cepa	1	21	18.03	0.0004
Día: Cepa	3	21	3.48	0.0339

CV 103.18

La prueba de Fisher indica un crecimiento radial en función de los días transcurridos en la observación, por lo tanto, la Figura 24 de crecimiento aumenta a partir del tercer día.

En la cepa Comercial y de la Granja la Pradera el crecimiento radial durante el día tres es 1.15 cm mayor al día 1, de este modo al día nueve presenta un crecimiento radial con el 79% más que en el día seis.

Figura 24
Crecimiento radial Beauveria bassiana



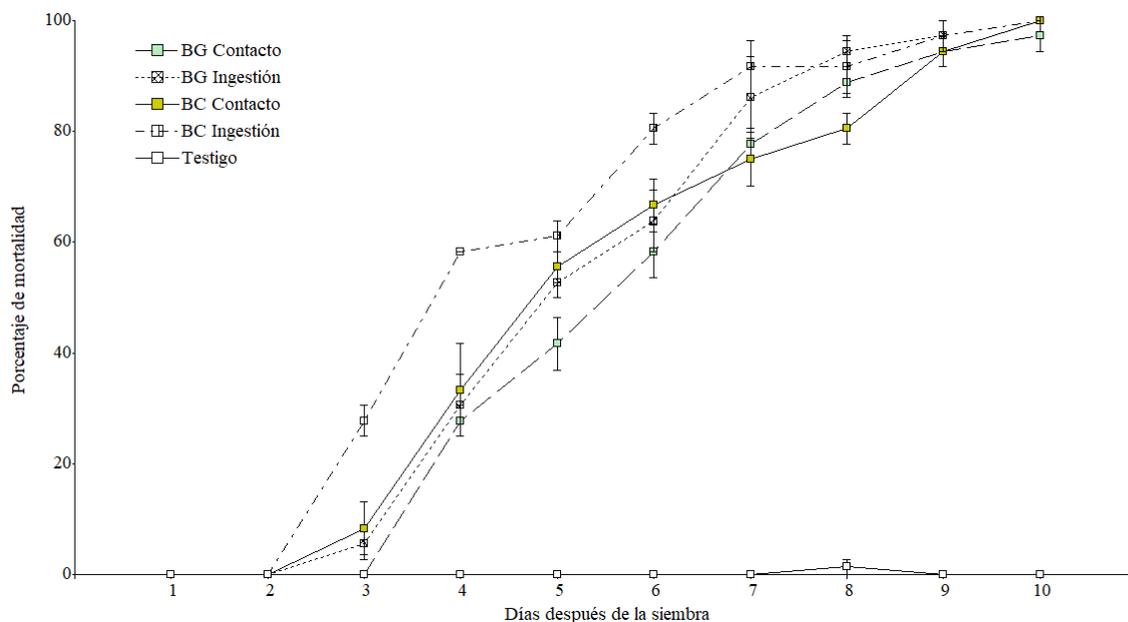
En la figura 24 se atribuye un crecimiento ascendente del 79% durante 9 días para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. comercial, mientras que el 63% se atribuye a *Beauveria bassiana* granja, demostrando que hay una interacción entre día y cepa. En virtud de los resultados Echeverría (2006) menciona que el crecimiento debe ser de forma expansiva y homogénea alrededor del círculo inoculado en esta investigación los resultados muestran diferencia ya que la evolución radial de *Beauveria bassiana*, tiene una conducta lineal, iniciando un incremento notorio a partir de los tres días evaluado. A la vez Díaz y Lecuona (1995) plantean un máximo de 1.3 cm al noveno día de crecimiento radial con *Beauveria bassiana*, valor que asemeja a la presente investigación con las cepas evaluadas, finalmente se menciona que la cepa que alcance el máximo de crecimiento radial no siempre alcanza la mayor producción de conidios, resultado que sustenta a patogenicidad.

Las cepas en estudio permitieron analizar el crecimiento radial de las colonias, para una comparación morfológica entre las muestras del género *Beauveria*. Los aislados presentan crecimiento concéntrico, sin embargo, la cepa *Beauveria b.* comercial muestra diferencias significativas respecto a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. granja, esto se pudo apreciar debido a un crecimiento algodonado aterciopelado de color blanco, es decir la conformación de conidióforos.

4.4. Patogenicidad

Para el porcentaje de mortalidad se realizó una prueba de Friedman en el cual se puede observar que existe diferencia significativa en cuanto a días, hongo y aplicación ($p=0.001$), para la variable patogenicidad.

Figura 25
Porcentaje de mortalidad



Como se puede apreciar en la figura 25, con el transcurso de los días el porcentaje de mortalidad de *Beauveria bassiana* aumento en un 29% para el noveno día de observación, a partir del tercer día en donde mostro un 23.4%. Durante las primeras observaciones a partir del tercer día entre los tratamientos T1(*B. bassiana* granja contacto), T4(*B.bassiana* comercial contacto) y el testigo presentan una media de 56%, sin embargo, en el tratamiento T2 (*B. bassiana* granja ingestión), T5 (*B.bassiana* comercial ingestión) y testigo se diferencia estadísticamente del 50%, considerando estos resultados se puede concluir que el testigo no presenta porcentaje de mortalidad.

En la figura 25, los resultados obtenidos permitieron determinar que el porcentaje más alto 91.67% corresponde a la infección a través de la ingestión de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. mientras que en la aplicación por contacto se obtuvo una mortalidad del 80.56%. Los resultados demuestran que los dos métodos de inoculación tienen potencial para el control biológico de *D. juno* al octavo día teniendo una mortalidad del 100% en días posteriores.

En la Figura 25, se puede observar el número de insectos muertos como resultado de la infección de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., evidenciándose que el mejor efecto está representado por ingestión, el cual a los 8 días alcanza el 93.06% de mortalidad, en tanto que el segundo mejor desempeño se atribuye al contacto presentando un porcentaje de mortalidad del 88.89%. Malpartida et al. (2013) mencionan que la utilización de *Beauveria bassiana* B., en una concentración de 2.1×10^6 alcanzó un porcentaje mortalidad entre el 60% y el 70%, en un periodo comprendido entre 24 y 72 horas, sin embargo el comportamiento de mortalidad varió según el número de horas después de la aplicación, es por ello que en este ensayo se identificó que *Beauveria bassiana* comercial con una concentración de 1×10^6

presentó los mejores resultados a las 72 horas con el 18.06%, no obstante a las 196 horas las cepas alcanzan el 100% de mortalidad.

En la tabla 11 se observan los resultados del análisis de varianza, realizado para la variable patogenicidad en *D. Juno* (Bates), en donde existen diferencias significativas entre días (566.44; gl=9,78; P 0.0001) y hongo (24.55; gl=1,78; P 0.0001), por lo que se puede determinar que la mortalidad varía en días y hongo entomopatógeno.

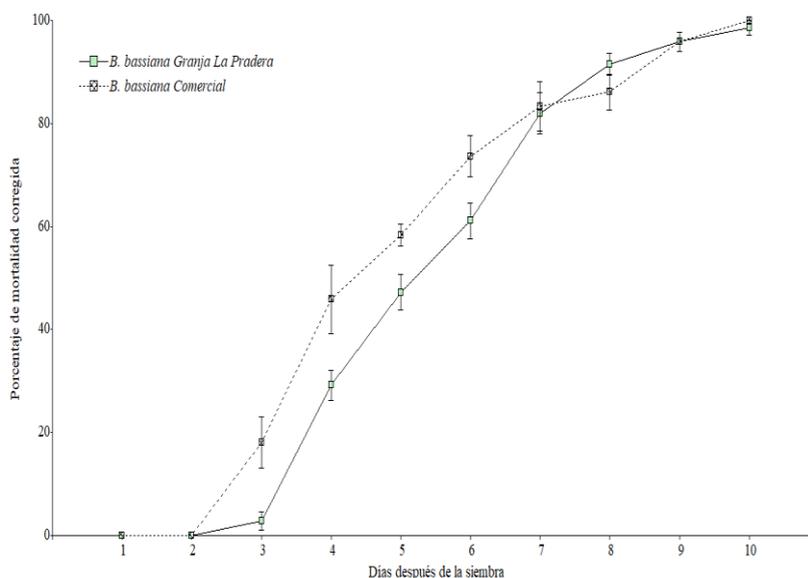
Se evidencia que existe interacción entre días y hongo (5.31; gl=9,78; P 0.0001), días y método de aplicación (2.60;gl=9,78;P 0.0224), por lo cual se determina que el comportamiento de patogenicidad del hongo entomopatógeno difiere entre los géneros a prueba (Tabla 11), por lo que se acepta la hipótesis alternativa de que al menos una de las formas de aplicación de *Beauveria* sp. resulta eficiente en el biocontrol de *Dione junco* (Bates).Estos resultados infieren en que la infestación varía entre día y hongo entomopatógeno.

Tabla 11

Análisis mortalidad de corregida

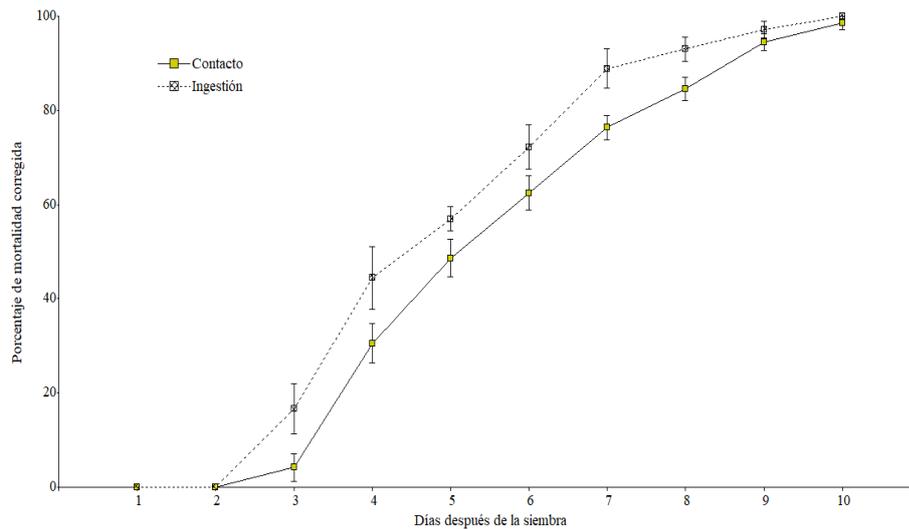
F.V.	GI T	GI E	Valor-F	Valor-P
Días	9	78	546.44	<0.0001
Hongo	1	78	24.55	<0.0001
Días: hongo	9	78	5.31	<0.0001
Días: aplicación	9	78	2.60	0.0224
Días: hongo: aplicación	9	78	1.57	0.1387

Figura 26
Porcentaje de mortalidad corregida



En la aplicación de *Beauveria bassiana* en el insecto defoliador Dione juno (Bates), se realizó una evaluación para determinar la mortalidad, los resultados de los análisis indican que para la variable mortalidad existe una interacción entre día y hongo (Tabla 11). La mortalidad en el control biológico (Figura 26) indica que el mejor resultado tiene *B. bassiana* comercial, sin embargo desde el séptimo día *B. bassiana* granja muestra resultados que se asemejan al comercial. Los porcentajes de mortalidad considerados en el experimento, muestran que la dosis máxima (1×10^6), logra eliminar a todas las larvas consideradas en la población inicial, con un porcentaje de mortalidad del 100% por micosis en días posteriores al octavo día, señalándose como la concentración más agresiva para las larvas de tercer estadio.

Figura 27
Porcentaje método de aplicación



Según Estrada y Ojeda (2017) la colonización por ingestión tuvo mayor eficacia que la realizada por suspensión de conidios. Hernández y Berlanga (1999) plantean que *Beauveria bassiana* infecta insectos no solo a través del intestino, sino también por los espiráculos, por lo tanto esta propiedad le ofrece la posibilidad de infectar huéspedes independientemente de los hábitos alimenticios del insecto

Como se aprecia en la Figura 27 *Beauveria bassiana* procedente de la granja Experimental La Pradera en su aplicación por contacto, presentó contaminación a las 96 horas con casi una larva y evoluciona hasta 2 larvas a las 120 horas siendo muy por debajo de los desempeños mostrados por *Beauveria* sp. que sus mejores niveles son a las 72 horas e infectaron los 4 insectos a las 216 horas. La baja eficacia de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. por contacto pudo ser por diversos factores como la humedad relativa, fotoperiodo, tipo de insecto, temperatura, entre otros, así lo determina Catón et al. (2011) quienes afirman que la humedad relativa adecuada para el género *Beauveria* es de 90% durante 14 horas para obtener una mayor infestación, además se requiere temperatura de 25 a 30°C, Por otro lado en esta investigación se utilizó una temperatura de 22±2°C y humedad relativa del 90%, entonces se podría decir que estos factores influyeron en la infestación de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. por contacto.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- En condiciones de laboratorio la caracterización macroscópica y microscópica de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. procedente de Granja la Pradera, permitió determinar de forma fisiológica la calidad biológica, ya que presentó un porcentaje de germinación del 80.25% y un crecimiento radial que alcanza el 79% al noveno día de siembra.
- La cepa comercial *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. fue patogénica para larvas en el tercer estadio de vida, alcanzando una mortalidad del 91.97% con la concentración 1×10^6 conidios/ml, ya que a las 72 horas de su aplicación presentó capacidad de infección. La cepa *Beauveria bassiana* Granja La Pradera presentó una mortalidad de 80.56%, indicando así que *Dione juno andicola* (Bates) es susceptible al ser controlado por *Beauveria bassiana*.
- Además, esta investigación demostró que los dos métodos de aplicación tienen potencial para el control biológico de *Dione juno* (Bates), en donde los aislamientos presentaron un comportamiento diferencial respecto a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. granja a una concentración de 1×10^6 conidios/ml, en condiciones de laboratorio, considerando así que este hongo entomopatógeno, es un agente de control biológico.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar el control biológico como una alternativa en el programa de manejo integrado de plagas para *Dione juno* andicola (Bates), ya que el uso de pesticidas químicos provoca efectos negativos en el ambiente, en vista de ello los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. deben ser usados en el control de insectos plaga, permitiendo la preservación de los recursos naturales y la producción de buena calidad.
- Realizar un análisis molecular, con el objetivo de obtener una identificación de la especie.
- Se recomienda usar procesos de desinfección con hipoclorito de sodio en el insecto plaga, para evitar la presencia de agentes contaminantes, en los procesos de evaluación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvites, S. (2012). *Determinación del ciclo biológico del gusano negro del maracuyá Dione juno juno bajo condiciones no controladas* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión]. Archivo digital.

<https://es.scribd.com/doc/163246658/determinacion-del-ciclo-biologico-del-gusano-negro-del-maracuya-dione-juno-juno-cramer-bajo-condiciones-no-controladas>

Badii, M. H. y Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Consciene*, 1(1), 82–89. [http://www.spentamexico.org/v1-n1/1\(1\)%2082-89.pdf](http://www.spentamexico.org/v1-n1/1(1)%2082-89.pdf)

Cañedo, V. y Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org

Ortiz-Catón, M., Alatorre-Rosas, R., Valdivia-Bernal, R., Ortiz-Catón, A., Medina-Torres, R., y Alejo-Santiago, G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Revista bio ciencias*, 1(2),42-53.

Cerdas, M. y Castro, J. (2003). *Manual práctico para la producción , cosecha y manejo de granadilla*. Ministerio de Agricultura y Ganadería.

http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-granadilla.pdf

Cisneros, F. (2005). Control de Plagas Agrícolas: 9. Control Químico. *AgriFoodGateway*, 1–122.<https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/control-quimico-de-plagas.pdf>

Correal, C. E., Aracelly, L., Torres, T., Fernanda, L., Rivero, V., Enrique, A., Pardey, B., Victoria, M., Mogollón, Z., Marina, A. y Prado, C. (2018). Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga Entomopathogenic fungi in insect pests biological control. *Control Biológico de Fitopatógenos, Insectos y Ácaros*, 1(1056). <http://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/21/13/166-1?inline=1>

Chiriboga, H.,Gómez, G. y Garcés, K.(2015). Protocolos para formulación y aplicación del Bio-insumo: *Beauveria bassiana*, Hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú).*ICCA*,28. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=61A1DD2CD08CCEFC36A81942FC285AA6?sequence=1>

Delascio-Chitty, F. (2006). El género *Passiflora l.* en el hatillo piñero, Estados Cojedes, Venezuela. *Acta botánica Venezuela*, 29 (1), 27-37.

<https://www.redalyc.org/pdf/862/86229103.pdf>

Díaz, B. y Lecuona, R. (1995). Evaluación de las cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromycotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). 7, 33-38.

file:///C:/Users/Dell/Downloads/2450-Texto%20del%20art%C3%ADculo-7626-1-10-20120801%20(1).pdf

Durán Ramírez, F.(2007). *Control de plagas y enfermedades en los cultivos*. Grupo Latino Editores Ltda.

Echevería, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin*. [Tesis de pregrado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. Archivo digital.

<https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/463/Trabajo%20Final%20de%20Graduacion%20Biblioteca.pdf?sequence=1>

Estrada, M. y Ojeda, R.(2017). Caracterización patogénica del hifomiceto entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista Cumbres*,3(1),69-75. file:///C:/Users/Dell/Downloads/122-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1243-1-10-20170825%20(1).pdf

Flórez-M, M. C., López-N, J. C., y Valencia-Jiménez, A. R. (2005). Actividad de amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 123-126.

<https://revistacolombianaentomologia.univalle.edu.co/index.php/SOCOLEN/article/view/9431>

Gandarilla-Pacheco, F. L., Morales-Ramos, L. H., Pereyra-Alfárez, B., Elías-Santos, M. y Quintero-Zapata, I. (2018). Production of infectious units of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) from different indigenous isolates of northeastern Mexico using 3 propagation strategies. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.008>

Gaona-Gonzaga,P., Vásquez-Rojas, L.,Aguayo-Pacas,S.,Viera-Arroyo,W.,Viteri-Díaz,P.,Sotomayor-Correa,A.,Medina-Rivera, L.,Mejía- Bonilla, P., Cartagena-Ayala, Y. (2020). Respuesta del cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) cultivar "Colombiana" al suministro de nitrógeno y potasio por fertirriego. *Revista de investigación científica Manglar*, 17(1). <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/149/265>

García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L. y Martínez, R. F. M. (2008). Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *Kuxulkab*, 15(27), 25-28. <http://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/846>

Gato, Y., Márquez, M., Baró, Y., Porras, Á., Ulloa, Y., y Quesada, Y. (2016). Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius fabricius* (Coleoptera: Brentidae). *Rev. de Protección Veg.*, 31(11), 50-56.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000100007

Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., y Tenorio, M. (2014). *Manual de producción y uso de Hongos entomopatógenos*. Servicio Nacional de Sanidad Agraria Perú. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>

Hernandez, V. M. y Berlanga, P. (1999). Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida Microbial. *Centro nacional de referencia de control biológico*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172882/Ficha_CB_03_Beauveria_bassiana.pdf

Instituto Nacional de Censos y Estadísticas. (2013). Uso de plaguicidas en la agricultura. *Ecuadorencifras*, 1–15. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento_Tecnico-Uso_de_Plaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf

Stellman, J.(1998). Control Biológico. En R. Lawreys. (Ed.). *Enciclopedia de seguridad salud en el trabajo* (pp.27.2-27.20). Organización Intercacional del trabajo. <https://www.insst.es/documents/94886/161958/Sumario+del+Volumen+I.pdf/18ea3013-6f64-4997-88a1-0aadd719faac?t=1526457520818>

Mafla, A. M. L., Villamil, L. A. P. y Ibarra, T. B. (2004). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 43. https://doi.org/10.21930/rcta.vol5_num1_art:23

Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M. y Dale-Larraburre, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81. <https://doi.org/10.21704/rea.v12i1-2.440>

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2018). Diagnóstico productivo rubro granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en la provincia de Imbabura.

Miranda, D., Fischer, G., Carranza, C., Magnitskity, S., Casierra, F., Piedrahita, W. y Florez, L. (2009). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: Maracuyá, Granadilla, Gulupa y Curuba*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.

https://www.researchgate.net/profile/Gerhard-Fischer-2/publication/259346111_Cultivo_poscosecha_y_comercializacion_de_las_pasifloraceas_en_Colombia_maracuya_granadilla_gulupa_y_curuba/links/55e0d5b108aecb1a7cc58e7b/Cultivo-poscosecha-y-comercializacion-de-las-pasifloraceas-en-Colombia-maracuya-granadilla-gulupa-y-curuba.pdf

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

Ripa, R. y Larral, P. (2008). Manejo Integrado de Plagas (MIP). *Manejo de Plagas En Paltos y Cítricos*, 6(3), 41–50. <https://www.scribd.com/document/381821925/0901-b-8038093-Fc-17>

Rivera, B., Miranda, D., Avila, L. A. y Nieto, A. M. (2002). *Podas y labores complementarias en el cultivo de granadilla*. Manejo integral del cultivo de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss).
[file:///C:/Users/Dell/Downloads/Manejo%20integral%20del%20cultivo%20de%20la%20granadilla%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/Dell/Downloads/Manejo%20integral%20del%20cultivo%20de%20la%20granadilla%20(7).pdf)

Rodríguez, L. Lecuona, R. (2002). Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la Tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1), 67-83.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86431105>

Sánchez, A. L., Cadena, C. E. y Vergel, S. (2016). Caracterización del ciclo biológico de la mariposa *Dione oscura*, *Dione juno* (Nymphalidae: Heliconiinae). *Universidad Industrial de Santander, Escuela de Biología*. 1-31.
[file:///C:/Users/Dell/Downloads/CARACTERIZACION_DEL_CICLO_BIOLOGICO_DE_L%20\(16\).pdf](file:///C:/Users/Dell/Downloads/CARACTERIZACION_DEL_CICLO_BIOLOGICO_DE_L%20(16).pdf)

Sánchez-Jasso, J. M. y Rivas-Manzano, I. V. (2007). Ciclo biológico y hábitos alimentarios de *Dione juno* huascuma (Lepidoptera: Nymphalidae) del plantar, malinalco, estado de México. *Docplayer*.
<https://docplayer.es/108291317-Ciclo-biologico-y-habitos-alimentarios-de-dione-juno-huascuma-lepidoptera-nymphalidae-del-platanar-malinalco-estado-de-mexico.html>

Suarez Gómez, H. (2009). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* motschulsky (Coleoptera: curculionidae) plaga de maíz almacenado. *Intropica: Revista Del Instituto de Investigaciones Tropicales*, 4(1), 5.
<https://doi.org/10.21676/23897864.138>

Torres, D. y Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Asociación Española de ecología terrestre*, 13(3), 2-6.
<https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/201>

Valarezo, O. y Muñoz, X. (2011). Insecticidas de uso agrícola en el Ecuador. *Boletín Divulgativo No. 402*, 8.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1253/1/INIAP%20bolet%3%adn%20divulgativo%20401.pdf>

Vélez, P. E., González, M. T., Valderrama, A. M., Bustillo, A., y Montoya, E. (2000). Caracterización morfológica fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista Cenicafe*, 51(3), 196-206.
https://www.researchgate.net/publication/276057696_caracterizacion_morfologica_fisiologica_y_molecular_de_aislamientos_de_beauveria_bassiana

ANEXOS

Anexo 1

Medio de cultivo

Para el proceso de caracterización de *Beauveria bassiana*, se usó el medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA), a la dosis de 39g/l de agua destilada estéril.



Anexo 2

Beauveria bassiana comercial

Para la evaluación del ensayo se utilizó *Beauveria bassiana* comercial, procedente de una empresa de controladores biológicos, en una presentación de 500ml.



Anexo 3

Reactivos y antibiótico

Se usó tween al 80% para la dilución de esporas en agua destilada.

El antibiótico se utilizó 1ml en 300ml de medio preparado para evitar la proliferación de bacterias.

