



**“Evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *Rhipicephalus microplus* en laboratorio.”**

Romero Suarez, Johana Marina y Santos Pazmiño, Jhon Paul

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Agropecuaria

Trabajo de Integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria

Dr. Gómez Mendoza, Gelacio Antonio

23 de agosto del 2022

## Reporte de verificación de contenido



Evaluar formulaciones sólidas para la producción de condios ...

Scanned on: 19:4 August 19, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Identical Words          | 102  |
| Words with Minor Changes | 158  |
| Paraphrased Words        | 130  |
| Omitted Words            | 2470 |



Website | Education | Businesses



Firmado electrónicamente por:  
GELACIO ANTONIO  
GOMEZ MENDOZA

**Dr. Gómez Mendoza, Gelacio Antonio**

**Director**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Agropecuaria**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *Rhipicephalus microplus* en laboratorio”** fue realizado por los señores: **Romero Suarez, Johana Marina y Santos Pazmiño, Jhon Paul**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2022**



Firmado electrónicamente por:  
**GELACIO ANTONIO  
GOMEZ MENDOZA**

---

**Dr. Gómez Mendoza, Gelacio Antonio**

CI: 1708691645



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría

Nosotros, **Romero Suarez, Johana Marina** y **Santos Pazmiño, Jhon Paul**, con cédulas de ciudadanía n° 1724884380 y n° 1724791387, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *Rhipicephalus microplus* en laboratorio**" es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2022

Romero Suarez, Johana Marina

CI: 1724884380

Santos Pazmiño, Jhon Paul

CI: 1724791387



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Agropecuaria

### Autorización de Publicación

Nosotros, Romero Suarez, Johana Marina y Santos Pazmiño, Jhon Paul, con cédulas de ciudadanía n° 1724884380 y n° 1724791387, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *Rhipicephalus microplus* en laboratorio**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2022

Romero Suarez, Johana Marina

CI: 1724884380

Santos Pazmiño, Jhon Paul

CI: 1724791387

## Dedicatoria

A:

Mis padres, José y Gladys, por su incesante trabajo para formarme como persona y profesional, en el transcurso del tiempo he aprendido que soy el resultado de sus pequeños y grandes esfuerzos, de ustedes descubrí el arte de la pasión, responsabilidad y esmero.

Mi amado esposo, Vicente Obando, por su apoyo incondicional e innegable en esta etapa universitaria, en medio de las dificultades hemos dividido las cargas e incluso me ha cargado, puedo decir a viva voz “lo logramos”.

Mis suegros, Vicente Obando y Esther Falcones, por ser pilares sólidos y confortables en este periodo, de ustedes he conocido de cerca que la unión hace la fuerza.

Mis hermanos, Mónica, Nayra, Robinson, Diego y Diana, en situaciones de dificultad han sido esa pronta mano amiga, oportuna e idónea para solventar cualquier situación.

Mis sobrinos cercanos, Iris, Alisson, Cristell, Didier, Merichell, Alondra, Aelys y Ezequiel, son mi inspiración especial, no habrá satisfacción más grande que verlos volar muy alto y lejos.

Dios, por quien soy y para quien existo, sin duda alguna un mundo tan ordenado no es producto del azar.

“Todo lo malo que veas en mí, soy yo mismo. Todo lo bueno que veas en mí, es Cristo”

-Juan Calvino

Autora

Romero Suarez, Johana Marina

### **Dedicatoria**

Este trabajo de investigación se lo dedico a Dios por brindarme vida, salud y sobre todo paciencia para poder superar cada obstáculo presentado en mi vida académica.

A mis padres Ángel Santos y Sandra Pazmiño, que con su amor, consejos y ejemplo me han enseñado a ser un hombre estudioso, trabajador, responsable, honesto, ético, con principios y sobre todo con mucha humildad.

A mis hermanos Emerson Santos y Gina Santos, que con su apoyo y comprensión han sido un pilar fundamental para lograr este objetivo.

A mi esposa Gianella Murillo que, con su amor, apoyo, comprensión y predisposición para ayudar, ha sido un gran ejemplo para poder mejorar como ser humano y persona.

A mis hijos, Camila Santos y Khalet Santos, por inspirarme día a día a ser mejor, educándolos con ejemplo y disciplina tal como me educaron a mí.

A mis angelitos en el cielo, Ester Paucarima, Delia Iza, Cesar Pazmiño, Marcela Hernández y Patricio Pazmiño que por circunstancias de la vida hoy ya no están conmigo presencialmente, pero en su momento fue de ellos quien recibí más apoyo y hasta ahora con cada milagro sin explicación a lo largo de mi vida laboral y académica, sé que son ellos que me cuidan desde arriba, por eso y más, siempre estarán en mi corazón hasta mi último aliento.

Por todo lo anteriormente mencionado, esto es por y para ustedes.

“El aspecto más triste de la vida actual, es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría”.

-Isaac Asimov

Autor

Santos Pazmiño, Jhon Paul

## Agradecimiento

A:

Nuestra alma Mater, la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe - Sede Santo Domingo, por la instrucción y formación académica durante estos años, mi más grande gratitud a mis docentes, en especial al Ingeniero Freddy Enríquez, actual director de la Carrera de Agropecuaria.

La Ingeniera Mayra Ronquillo, por los conocimientos impartidos en la cátedra de Microbiología y Fitopatología, se cristalizaron en este proyecto de Integración Curricular.

La Estación Experimental Santo Domingo del INIAP, por el acceso a las instalaciones y el acompañamiento de los encargados del Departamento de Protección Vegetal, Ingeniero David Hidalgo, Ingeniera Mercedes Navarrete e Ingeniero Ricardo Ávila.

Nuestros amigos y colaboradores, Steven Ortiz, Ingeniero Irvin Zambrano, Ingeniera Cristina Tello, por infundirme ánimo y asistirme con sus conocimientos.

Al Ingeniero Vinicio Uday, Ingeniera Alicia Romero e Ingeniero Kumar Vivas, por su asesoría estadística.

Nuestro tutor de Proyecto de integración curricular, el Doctor Gelacio Gómez, por el seguimiento y respaldo en el transcurso del proceso investigativo.

Autores



## Índice de contenido

|   |    |
|---|----|
| Caratula.....                             | 1  |
| Reporte de verificación de contenido..... | 2  |
| Certificación.....                        | 3  |
| Responsabilidad de Autoría.....           | 4  |
| Autorización de Publicación.....          | 5  |
| Dedicatoria .....                         | 6  |
| Agradecimiento .....                      | 8  |
| Índice de contenido .....                 | 9  |
| Índice de tablas .....                    | 12 |
| Índice de figuras .....                   | 13 |
| Resumen.....                              | 14 |
| Abstract.....                             | 15 |
| Capítulo I.....                           | 16 |
| Introducción.....                         | 16 |
| Objetivos.....                            | 17 |
| Objetivo General .....                    | 17 |
| Objetivos específicos.....                | 17 |
| Hipótesis .....                           | 17 |
| Capítulo II.....                          | 18 |
| Marco teórico.....                        | 18 |
| Antecedentes.....                         | 18 |

|  |    |
|--|----|
|  | 10 |
| Fundamentación .....   | 19 |
| Los Hongos Entomopatógenos .....                             | 19 |
| Beauveria bassiana .....                                     | 21 |
| Isaria spp.....  | 22 |
| Medios de cultivos para aislar hongos entomopatógenos.....   | 23 |
| Sustratos sólidos arroz y cebada.....                        | 24 |
| Suplementos nutritivos .....                                 | 26 |
| Garrapata (Rhipicephalus microplus) .....                    | 29 |
| Capítulo III.....  | 32 |
| Metodología .....  | 32 |
| Ubicación del área de investigación .....                    | 32 |
| Materiales.....  | 33 |
| Métodos .....  | 34 |
| Variables medidas .....                                      | 38 |
| Métodos específicos de manejo del experimento .....          | 40 |
| Análisis costo/beneficio .....                               | 42 |
| Capítulo IV: .....   | 43 |
| Resultados y Discusión .....                                 | 43 |
| Germinación de conidios (%) .....                            | 43 |
| Concentración de conidios.....                               | 45 |
| Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC) ..... | 47 |

|   |    |
|---|----|
| Porcentaje de Pureza (Unidades Formadoras de Colonias, UFCs)..... | 49 |
| Pruebas de susceptibilidad en <i>R. microplus</i> .....           | 51 |
| Análisis Costo-Beneficio .....                                    | 53 |
| Capítulo V .....  | 57 |
| Conclusiones.....   | 57 |
| Capítulo VI .....   | 58 |
| Recomendaciones.....  | 58 |
| Capítulo VII .....  | 59 |
| Bibliografía .....  | 59 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 <i>Factores ambientales que determinan la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.</i> .....  | 20 |
| Tabla 2 <i>Composición Química del Arroz (Oryza sativa L.)</i> .....  | 25 |
| Tabla 3 <i>Composición Química de la Cebada (Hordeum vulgare)</i> .....   | 25 |
| Tabla 4 <i>Composición Química de la Leche en Polvo</i> .....   | 27 |
| Tabla 5 <i>Composición Química de la Harina de Quinoa</i> .....   | 27 |
| Tabla 6 <i>Composición Química de la Harina de Palmiste.</i> .....  | 28 |
| Tabla 7 <i>Composición Química de la levadura de cerveza (Saccharomyces cerevisiae L.)</i> .....  | 28 |
| Tabla 8 <i>Fases de la etapa no parasítica o de vida libre de R. microplus</i> .....  | 30 |
| Tabla 9 <i>Materiales, equipos, insumos, reactivos y organismos del proceso investigativo.</i><br>.....   | 33 |
| Tabla 10 <i>Factores y niveles propuestos en la evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp.</i> .....                  | 34 |
| Tabla 11 <i>Tratamientos planteados para evaluación de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp.</i> .....   | 35 |
| Tabla 12. <i>Esquema del análisis de varianza</i> .....   | 37 |
| Tabla 13 <i>Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas</i> .....                  | 43 |
| Tabla 14 <i>Análisis de varianza para la concentración de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas</i> .....                              | 45 |
| Tabla 15 <i>Análisis de varianza para la Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC) de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas</i> ..... | 48 |
| Tabla 16 <i>Análisis de varianza para el porcentaje de pureza de UFC de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas</i> .....                            | 50 |

Tabla 17. *Análisis Costo-Beneficio de las formulaciones a base de Beauveria spp.* .....55

Tabla 18 *Análisis Costo-Beneficio de las formulaciones a base de Isaria spp.* .....56

### Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 <i>Ubicación geográfica de la investigación</i> .....  | 32 |
| Figura 2. <i>Porcentaje de germinación de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.</i> .....   | 44 |
| Figura 3 <i>Concentración de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.</i> .....  | 47 |
| Figura 4 <i>Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC) de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.</i> .....                             | 49 |
| Figura 5 <i>Porcentaje de pureza de UFC de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.</i> .....  | 51 |
| Figura 6 <i>Interacción de la concentración de conidios de Beauveria spp. de diferentes formulaciones frente al porcentaje de mortalidad de larvas de R. microplus.</i> ..... | 52 |

## Resumen

La garrapata (*Rhipicephalus microplus*) es la principal especie parasitaria en el ganado bovino, especialmente en las razas lecheras. Ante el problema que representa el uso de químicos y la resistencia a los mismos, la utilización de hongos biocontroladores es una excelente estrategia para el control de garrapatas; sin embargo, existen estudios de producción masiva de bioformulados basándose solo en sustratos base, razón por la cual, al añadir suplementos nutricionales (Harina de palmiste, Harina de quínoa, Levadura de cerveza y Leche en polvo) se podría reducir recursos y maximizar la producción de conidios. La presente investigación pretende evaluar formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *R. microplus* en laboratorio, para ello se diseñaron dieciocho formulaciones combinadas con arroz y cebada. Las variables de calidad microbiológica fueron procesadas de acuerdo a un ADEVA y un Test de Tukey (0,05%), con el fin de garantizar su eficiencia en campo, además se contrastó su costo/beneficio. Los resultados mostraron diferencias significativas para la producción de conidios, el mejor tratamiento fue el T6, cuya formulación consistió en 2,5% Levadura de cerveza, 97,5% arroz + *Beauveria* spp. con una concentración de  $6,9 \times 10^9$  conidios/g. En cuanto al porcentaje de germinación de conidios a las 16 horas, el mejor tratamiento fue el T25 (5% Levadura de cerveza, 95% arroz + *Isaria* spp.) con un 82,5% de germinación. La mayor concentración de unidades formadoras de colonia (UFC) fue de  $2,64 \times 10^{10}$  UFC/g para el T6. En cuanto al porcentaje de pureza no mostró diferencias significativas para los 36 tratamientos. El análisis costos-beneficio determinó que el T6 representó una ganancia de \$2,10 por cada dólar invertido. La prueba de susceptibilidad en larvas de garrapatas con las cepas de *Beauveria* spp. no resultó patogénica por la falta de reactivación, no obstante, existió una correlación positiva, a mayor concentración de conidios mayor porcentaje de mortalidad.

**Palabras clave:** *Beauveria*, *Isaria*, Bioformulados, *Rhipicephalus microplus*,  
Concentración de conidios

### Abstract

The tick (*Rhipicephalus microplus*) is the main parasitic species in cattle, especially in dairy breeds. Given the problem that the use of chemicals and resistance to them represents, the use of biocontrol fungi is an excellent strategy for tick control. However, there are studies of mass production of bioformulated based only on base substrates, which is why, by adding nutritional supplements (palm kernel flour, quinoa flour, brewer's yeast and powdered milk) resources could be reduced and production maximized of conidia. This research aims to evaluate solid formulations for the production of conidia of *Beauveria* spp. and *Isaria* spp. and susceptibility in *R. microplus* in the laboratory, for which eighteen formulations combined with rice and barley were designed. The microbiological quality variables were processed according to an ADEVA and a Tukey Test (0,05%), in order to guarantee their efficiency in the field, and their cost/benefit was also contrasted. The results showed significant differences for the production of conidia, the best treatment was T6, whose formulation consisted of 2,5% Brewer's yeast, 97.5% rice + *Beauveria* spp. with a concentration of  $6,9 \times 10^9$  conidia/g. Regarding the percentage of germination of conidia at 16 hours, the best treatment was T25 (5% Brewer's yeast, 95% rice + *Isaria* spp.) with 82,5% germination. The highest concentration of colony forming units (CFU) was  $2,64 \times 10^{10}$  CFU/g for T6. Regarding the purity percentage, it did not show significant differences for the 36 treatments. The cost-benefit analysis determined that T6 represented a profit of \$2,10 for every dollar invested. The susceptibility test in tick larvae with *Beauveria* spp. it was not pathogenic due to the lack of reactivation, however, there was a positive correlation, the higher the concentration of conidia, the higher the percentage of mortality.

**Key words:** *Beauveria*, *Isaria*, *Bioformulated*, *Concentration of conidia*, *Rhipicephalus microplus* *concentration of conidia*

## Capítulo I

### Introducción

En los últimos diez años, ha sido de gran importancia para la comunidad científica, buscar formas de preservar el ambiente y evitar el desbalance ecológico al introducir sustancias nocivas. Por este motivo se exploró la incorporación de hongos entomopatógenos por los beneficios que traería al sector ganadero como controladores de garrapatas, estos son de aplicación sencilla y menos costosa (Pucheta, 2006).

El crecimiento y desarrollo de los hongos está limitado principalmente por condiciones medioambientales adversas, especialmente: radicación solar, baja humedad y altas temperaturas (Góngaras, Marín, & Benavides, 2009). Las unidades de reproducción de los hongos son llamadas esporas o conidios, que usualmente son las que infectan a los insectos. El proceso de infección comprende tres etapas: 1. Adhesión y germinación de conidios a la cutícula del insecto y germinación; 2. Penetración de la cutícula del insecto; 3. Colonización del hongo en el interior del insecto, que generalmente termina en la muerte (Padilla, 2017).

Las infestaciones de garrapatas producen el mayor problema global de ectoparásitos en ganado de regiones tropicales y subtropicales, provocando grandes pérdidas económicas en la producción bovina. El control de *R. microplus* se basa principalmente en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de resistencia en las principales familias de este derribante (Rodríguez, et al., 2014).

La producción de hongos entomopatógenos para el control de plagas implica una amplia investigación que involucra disciplinas como: Patología, Ecología, Genética y Fisiología, además de técnicas para la producción masiva, formulación y estrategias de aplicación (Rodríguez, et al., 2014).

De acuerdo a Merino (2017), el uso de aditivos podría mejorar la germinación y la producción de conidios; sin embargo, se necesitan sustratos base sólidos adecuados para potencializar su concentración, además contrastar el Costo/Beneficio, que es una limitante para



la producción en masa de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. La comprensión de las necesidades nutricionales de los entomopatógenos, es otro factor esencial para su producción. Los cereales, son los sustratos naturales más adecuados para el crecimiento del micelio superficial y la producción de conidios en hifas aéreas (Rodríguez, y otros, 2017).

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y la susceptibilidad en *Rhipicephalus microplus* en laboratorio.

### ***Objetivos específicos***

Determinar el efecto en la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. adicionando suplementos nutritivos al sustrato base (Arroz y Cebada)

Realizar pruebas de susceptibilidad con *Beauveria* spp. a larvas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en fase de laboratorio.

Conocer la relación Costo/Beneficio de los diferentes tratamientos para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp.

## **Hipótesis**

**Ho:** No existen diferencias estadísticamente significativas entre formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp.

**Ha:** Al menos existe una diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones sólidas para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp.

## Capítulo II

### Marco teórico

#### Antecedentes

Entre los hongos entomopatógenos más conocidos esta *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. estos géneros se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y que forma parte de los entomopatógenos más destacados, debido a su capacidad de infectar a más de 200 especies de nueve órdenes de insectos (Zimmermann, 2007).

Estos hongos han sido aislados, cultivados y ensayados en laboratorio para el control de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*). Es importante comprender los aspectos básicos del desarrollo de los hongos entomopatógenos y tener un conocimiento detallado de los requerimientos nutricionales para su crecimiento y esporulación, esencial para emprender su producción masiva y facilitar su comercialización (Fernandez, 2020).

El presente trabajo de Integración Curricular es con el interés de producir y evaluar los hongos *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. en la Estación Experimental Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, con la finalidad de su aplicación en laboratorio, para la producción masiva de hongos entomopatógenos usando sustratos sólidos como el grano de arroz (*Oryza sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare*) más suplementos (Harina de palmiste, harina de quinua, levadura de cerveza y leche en polvo), para mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial tomando en cuenta el balance nutricional y algunas condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en términos de aireación y humedad, para así poder realizar la valoración de los parámetros, como el número de conidios, utilizando blastosporas como pre-inóculo sobre diferentes fórmulas sólidas, específicamente cereales más suplementos de bajo costo comercial.

## **Fundamentación**

### ***Los Hongos Entomopatógenos***

Son una agrupación especial de microorganismos que habitan en el suelo, que biocontrolan insectos y otros artrópodos a través de la penetración de la cutícula; aunque se aíslan principalmente de los cadáveres de sus víctimas, su hábitat natural es el suelo (Mantzoukas, Kitsiou, Natsiopoulos, & Eliopoulos, 2022). Los hongos entomopatógenos no forman un grupo monofilético; hasta el momento, se han reportado 12 especies de Oomycetes, 65 especies de Chytridiomycota, 339 especies de Microsporidia, 474 especies de Entomophthoromycota, 238 especies de Basidiomycota y 476 especies de Ascomycota (Litwin, Nowak, & Różalska, 2020).

Sin embargo, la mayoría de los hongos que contribuyen a la regulación natural de estas poblaciones son de los órdenes Hypocreales y Entomophthales. Estos últimos son difíciles o imposibles de producir en masa y, por lo tanto, no se han producido comercialmente ni se han aplicado a gran escala. En contraste, varias especies de Hypocreales están comercialmente disponibles para el control de plagas de ácaros e insectos; algunos de estos pertenecen a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Aschersonia*, *Hirsutella* y *Lecanicillium* (Robles, y otros, 2019). La patogénesis de estos microorganismos, requiere la participación de varios agentes infecciosos, entre los que se destacan: las adhesinas, metabolitos secundarios y las enzimas líticas (Litwin, Nowak, & Różalska, 2020).

### **Factores que determinan efectividad de hongos Entomopatógenos**

La eficacia de las esporas fúngicas requiere una concentración crítica para provocar la infección y la mortalidad de los insectos. La alta densidad de esporas aumenta las posibilidades de enfermedades de los insectos mediante la producción de propágulos infecciosos adecuados. Las cepas fúngicas virulentas deben ser compatibles con el insecto huésped objetivo, lo que se basa en parte en la capacidad del patógeno para detectar y conquistar la barrera defensiva del huésped. Los factores ambientales también afectan la interacción

huésped-patógeno, lo que influencia sobre la capacidad del patógeno para inducir la enfermedad. Las cepas que sobreviven bien en el campo son ecológicamente aptas y pueden penetrar efectivamente en un huésped (Qayyum et al., 2021). En la tabla 1, que se presenta a continuación, se muestran los factores ambientales que determinan la patogenicidad del hongo:

**Tabla 1**

*Factores ambientales que determinan la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.*

| Factores        | Descripción   |
|-----------------|---|
| Temperatura     | Las cepas de ambientes más cálidos funcionan mejor a temperaturas más altas, mientras que las de climas más fríos funcionan mejor a temperaturas más bajas. |
| Precipitación   | Juega un rol fundamental en la dispersión de los conidios; sin embargo, cuando son fuertes pueden eliminar grandes cantidades de esporas.                   |
| Radiación solar | La viabilidad de conidios es inhibida por los rayos solares UVA (320 – 400 nm) y UVB (290 – 320 nm).  |
| Humedad         | Se requiere de una humedad > 96 % para que germinen las esporas y se produzca el desarrollo micelial.   |

Nota: La tabla presenta los diferentes parámetros ambientales que influyen sobre el efecto patógeno de los hongos. Adaptado de Qayyum et al. (2021).

### **Necesidades nutricionales de los hongos entomopatógenos**

Los sustratos están conformados por biomoléculas, y estos a su vez de macro y micro elementos, los mismos que involucran la interacción huésped patógeno y estos son responsables del crecimiento del micelio y producción de conidios (Merino, 2017).

Para la producción industrial de hongos entomopatógenos, la relación carbono nitrógeno es uno de los parámetros más críticos, la cual afecta directamente a la esporulación,

crecimiento de conidios y su patogenicidad en el sustrato que se cultiva (Mustata & Gurvinder, 2009).

Para considerar un sustrato como idóneo para producción de conidios de una cepa aislada de un entomopatógeno, debe tener una alta productividad y rendimiento, lo cual depende del alto contenido de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas del complejo B y una concentración de iones necesarios para el crecimiento, esporulación y patogenicidad duradera (Fernandez, 2020).

### ***Beauveria bassiana***

Se ha demostrado que este hongo perteneciente al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Cordycipitaceae. *Beauveria* es un patógeno de insectos generalista, anómrfico y cosmopolita que comúnmente se encuentran en la rizósfera de los suelos formando relaciones complejas con las plantas. Pueden ser saprótrofos o endófitos (25 especies) de raíces, hojas y tallos en plantas, además se ha demostrado que contribuyen con la aportación de nitrógeno en vegetales, que se asimila durante la parasitación del insecto (Litwin et al. 2020). Esta especie se puede desarrollar mejor en rangos de temperatura que van de 25 a 30°C (Qayyum, Bilal, Naeem, Ali, & Raza, 2021)

### **Características morfológicas**

*B. bassiana* generalmente aparece como un crecimiento algodonoso o harinoso, blanco y suelto, que a veces envuelve completamente al insecto. Los conidióforos forman conidios compactos, de color blanco cremoso. El hongo crece más rápidamente en medios artificiales donde produce un tipo de crecimiento algo más esponjoso que, sobre el tegumento de algunos insectos y ácaros, puesto que requiere de condiciones de temperatura y humedad adecuadas (Irving, 2012). El género *Beauveria* a nivel microscópico puede observarse como un micelio septado, con conidióforos simples o en agrupación por su ramificación, los cuales varían en 1 a 2 micras de diámetro y 2 a 3 micras de largo; a partir de estas se originan los conidios hialinos

en forma redonda y ligeramente ovalada, estas suelen medir de 2 a 3 micras (Chiriboga, Gómez, & Garcés, 2015).

### **Proceso de infección**

Las esporas de *Beauveria* se caracterizan por su resistencia a las alteraciones climáticas extremas; durante la etapa infectiva del ciclo de vida, las esporas producen la infección de forma directa atravesando piel del insecto. En condiciones favorables el conidio adherido a la cutícula del huésped, crece y secreta enzimas que atacan y disuelven la cutícula, permitiendo así atravesar la piel y crecer dentro del cuerpo del huésped. Cuando el hongo se encuentra dentro del insecto o artrópodo, empieza a secretar una toxina llamada "beauvericina" que debilita su sistema inmunológico. Después de que el individuo parasitado muere, se produce un antibiótico (oosporeína) que permite que el hongo supere a las bacterias intestinales. Finalmente, toda la cavidad del cuerpo se llena de masa fúngica. Si las condiciones son óptimas, el hongo crecerá a través de las partes más blandas del cuerpo del insecto, produciendo el aspecto característico de "floración blanca". La humedad relativa debe ser del 92% o más para que *B. bassiana* crezca fuera del insecto. Estas hifas externas producen conidios que maduran y se liberan al medio ambiente, completando el ciclo. Además de parasitar, *B. bassiana* puede colonizar plantas de maíz y tiene la capacidad de vivir en el tejido vascular de ciertos cultivares de maíz como endófito (Irving, 2012).

Conforme a Merino (2017) los conidios de *B. bassiana* germinan a una temperatura de 25-30°C, con un pH óptimo de crecimiento localizado entre el rango de 5,7 a 5,9; sin embargo, para llegar a la fase de producción de los conidios se necesita un lapso de 7 a 9 días y para visualizarlo como una masa algodonosa, se requieren de 15 días.

### ***Isaria* spp.**

*Isaria* es un género que pertenece a la clase ascomycota del orden Sordariomycetes y la familia Cordycipitaceae. Algunas especies de mayor relevancia relacionadas con este género están *I. fumosorosea*, *I. tenuipes*, e *I. farinosa* puesto que, han demostrado ser potentes

agentes de control biológico para insectos; sin embargo, solamente la especie *I. fumosorosea* se ha establecido como un ingrediente activo de interés comercial (Narcizo, 2012).

### **Características morfológicas**

La coloración de los hongos de este género, es amarillenta, con hifas septadas y de paredes finas. Gran parte de estos micelios, son ramificados de forma verticilar o de manera regular; la parte terminal de sus ramas se destaca por la formación de fiálides, aunque también pueden encontrarse de manera solitaria; que se encuentran segmentadas en una zona basal o hinchada, que se adelgaza de forma abrupta hasta formar un cuello prominente. Los conifióforos por su parte, están formados por cadenas de conidios hialinas, de una sola célula ovoide (Narcizo, 2012).

### **Proceso de infección**

Las esporas de *Isaria* spp. al iniciar el contacto con la cutícula del huésped, inician su adhesión que poco a poco le permiten penetrar la pared de forma directa para iniciar la germinación de los conidios (formación de tubo germinativo); aunque también puede ocurrir a través de un apresorio en conjunto con la producción de enzimas (quitinasas, proteasas, lipasas). Posterior al desarrollo del hongo, las toxinas liberadas provocan el deceso del individuo. En *I. fumosorosea* se ha descubierto que, su adhesión ocurre en la parte dorsal del huésped, donde posteriormente el tubo germinativo penetra y luego de un día las hifas se pueden divisar en homocelo (Narcizo, 2012).

### **Medios de cultivos para aislar hongos entomopatógenos**

#### **Agar – Agar**

Es un componente solidificante vegetal de origen marino usado en la preparación de los medios de cultivo. Está compuesto por un polisacárido no ramificado, que es obtenido a partir de la pared celular de varias especies de algas que pertenecen a los géneros: *Gracilaria*, *Gelidium* y *Euchema*. El agar, atraviesa por un proceso de licuefacción que es llevado a temperatura de ebullición y posteriormente, se solidifica cuando se enfría; existen ciertas

excepciones donde su efecto no resulta, tal es el caso de la producción de bacterias, además no es atacado por aquellas que crecen en él (Merino, 2017).

### **Formulación de hongos entomopatógenos**

Estas formulaciones, corresponden a la mezcla del ingrediente activo, en conjunto con los materiales inertes como solventes, emulsificantes que le protegen durante la aplicación, evitando la sedimentación y grumos que tapen las boquillas del aspersor, es por ellos que uno de los factores clave para el efecto positivo del control biológico, depende de las formulaciones que se implementan para el ingrediente activo (IA). Existen productos a base de *Beauveria* spp e *Isaria* spp, sin embargo, existe literatura del gran potencial de la misma pero en campo es de baja efectividad, por lo que es importante estudiar los factores que determinan su efectividad y aumentar su potencial como producto viable, es por ello, que el material con el que se mezclan los (HE) deben proteger a las esporas y no afectar su actividad, además de que estos componentes otorguen una vida de almacenaje y posea las características para atraer a la plaga (Mejía, 2018).

### **Sustratos sólidos arroz y cebada**

Existe una amplia variedad de cereales, entre ellos se encuentran, el arroz (*Oryza sativa* L), la cebada (*Hordeum vulgare*), el maíz (*Zea mays* L.), la avena (*Avena sativa*) y el trigo (*Triticum* spp). Sin embargo, en la actualidad los granos más utilizados en la producción en masa de los conidios aéreos en los hongos Hypocreales son el arroz y el maíz (Merino, 2017).

El arroz (*Oryza sativa* L.) y la Cebada (*Hordeum vulgare*), son los sustratos más usados para la producción masiva de hongos entomopatógenos, porque mantiene características físicas ideales, como la superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutricional y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad (Madrigal, 2007).



**Tabla 2***Composición Química del Arroz (Oryza sativa L.)*

| Arroz grano entero | Contenido/100g |
|--------------------|----------------|
| Agua %             | 13,00          |
| Calorías           | 360            |
| Proteínas g        | 6,8            |
| Grasas g           | 0,70           |
| Carbohidratos g    | 78,90          |
| Almidón, Fibra g   | 0,20           |
| Cenizas g          | 0,60           |
| Calcio mg          | 6,0            |
| Hierro mg          | 0,80           |
| Fósforo mg         | 1,40           |
| Tiamina mg         | 0,12           |
| Cobre mg           | 0,4            |
| Zinc mg            | 5,1            |
| Fe mg              | 3,7            |
| Riboflavina mg     | 0,03           |
| Niacina mg         | 1.5            |

Nota. Fuente (Hernández & Villanova, 2010).

**Tabla 3***Composición Química de la Cebada (Hordeum vulgare)*

| Cebada grano entero | Contenido/100g |
|---------------------|----------------|
| Agua %              | 9,44           |
| Calorías            | 354            |

|                  |       |
|------------------|-------|
| Proteínas g      | 21,48 |
| Grasas g         | 2,30  |
| Carbohidratos g  | 73,48 |
| Almidón, Fibra g | 17,3  |
| Cenizas g        | 0,10  |
| Calcio mg        | 33    |
| Hierro mg        | 3,60  |
| Fósforo mg       | 264   |
| Tiamina mg       | 0,65  |
| Riboflavina mg   | 0,28  |
| Niacina mg       | 4,60  |

*Nota.* Fuente: Carbadillo (2022).

### **Suplementos nutritivos**

Los suplementos nutritivos, se emplean en el laboratorio y la industria para el crecimiento del hongo entomopatógeno; por lo que, es preciso el control de la población celular y el conocimiento de cómo se reproducen. Así mismo, las condiciones abióticas que necesitan y los requerimientos nutricionales son indispensables al momento de diseñar métodos de control para el crecimiento masivo microbiano. Los principales requerimientos nutricionales para la producción de los conidios son: el carbono, el fósforo y las fuentes de nitrógeno. Conjuntamente una adecuada temperatura, pH, actividad del agua y el intercambio los gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>). Existen varios medios, los más comunes son: los líquidos, el agar y las FES. La relación carbono-nitrógeno (C: N) en el medio o sustrato sólido es uno de los parámetros más críticos para aumentar la producción de los conidios, porque afecta en gran medida el crecimiento del hongo y la esporulación (Kruger, 2008).

**Tabla 4***Composición Química de la Leche en Polvo.*

| Parámetros    | Contenido/100g |
|---------------|----------------|
| Proteína g    | 24,90          |
| Humedad       | 2,51           |
| Grasa g       | 29,42          |
| Ceniza g      | 5,40           |
| Carbohidratos | 37,27          |

*Nota.* Fuente: Polit (2013).**Tabla 5***Composición Química de la Harina de Quinoa*

| Parámetros        | Contenido/100g |
|-------------------|----------------|
| Proteína g        | 16,3           |
| Grasa g           | 4,7            |
| Carbohidratos g   | 76,2           |
| Fibra cruda g     | 4,5            |
| Cenizas g         | 2,8            |
| Cobre mg          | 5.1            |
| Zinc mg           | 4,4            |
| Fe mg             | 13,2           |
| Energía (Kcal/100 | 399            |

*Nota.* Fuente: Romo et al. (2006)

**Tabla 6***Composición Química de la Harina de Palmiste.*

| Parámetros        | Contenido/100g |
|-------------------|----------------|
| Proteína g        | 15             |
| Grasa g           | 1,5            |
| Carbohidratos g   | 60,48          |
| Fibra cruda g     | 18             |
| Cenizas g         | 4,45           |
| Energía (Kcal/100 | 399            |

*Nota.* Fuente: Pacheco (1996).**Tabla 7***Composición Química de la levadura de cerveza (Saccharomyces cerevisiae L.).*

| Parámetros        | Contenido/100g      |
|-------------------|---------------------|
| Proteína g        | 46                  |
| Humedad           | 8,2                 |
| Grasa g           | 58                  |
| Carbohidratos g   | 6,8                 |
| Fibra cruda g     | 5,0                 |
| Cenizas g         | 7,2                 |
| Vitamina B        | Biotina y ac.fólico |
| Hierro mg         | 20                  |
| Zinc mg           | 5,2                 |
| Cobre mg          | 3.6                 |
| Energía (Kcal/100 | 269                 |

*Nota.* Fuente: Fedna (2011).

### **Garrapata (*Rhipicephalus microplus*)**

Este artrópodo se distribuye ampliamente en las regiones del trópico y subtropico en el planeta. Pertenece a la clase arácnida, de la familia Ixodidae, del género Rhipicéfalo. Es una de las principales limitantes en el manejo de ganado bovino, ya que reduce el incremento de peso, así como la producción lechera (Almazán, y otros, 2010). En Ecuador este tipo de garrapata perjudica la economía bovina en un 75% a nivel nacional; puesto que, se encuentra distribuida ampliamente desde los 0 hasta los 2600 msnm (Rodríguez, et al., 2017).

La garrapata del ganado *R. microplus* coevolucionó con los bovinos asiáticos (razas cebú) y debido a la migración global de *B. t. taurus* se reproduce en Europa para la producción lechera durante los siglos XVIII y XIX, esta garrapata se extendió por las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente, *R. microplus* se considera un complejo de especies, en el que existen diferencias geográficas reconocidas entre los 5 clados, incluidos los 3 clados de *R. microplus* (A, B y C), así como *R. australis* y *R. annulatus*. Cada taxón transmite tanto anaplasmosis como babesiosis y cada uno tiene un ciclo de vida parasitario en el ganado bovino de ~21 días. Las garrapatas del ganado se sienten atraídas por sus huéspedes a través de estímulos como el dióxido de carbono, la temperatura, las vibraciones, los estímulos visuales y el olor (Tabor, et al., 2017). La garrapata *R. microplus* tiene una fuerte preferencia por el ganado bovino *Bos taurus taurus* sobre el bovino *Bos taurus indicus* altamente resistente (Biegelmeier, et al., 2015).

Las garrapatas se han ido adaptando a una existencia de carácter hematófaga luego de que el sistema hemostático de los animales vertebrados evolucionara hacia un sistema de defensa de capas múltiples en contra de las invasiones extrañas (patógenos y ectoparásitos), la pérdida de sangre y las respuestas inmunitarias. Estos artrópodos evolucionaron al desarrollar la capacidad para suprimir el sistema inmunitario del huésped vertebrado con un impacto devastador, en particular para el ganado exótico y mestizo (Tabor, et al., 2017).

### Ciclo biológico

En cuanto al ciclo de vida de este ectoparásito, existe dos fases: la parasitaria que se caracteriza por la succión de sangre del huésped; y la de vida libre, que abarca la oviposición y las mudas. En este último, se distinguen las garrapatas duras que se encuentran en un estado inactivo o de huevo, mientras que en la parasitaria sus estados móviles les permiten alimentarse (larva, ninfa y adulto) (Bustillos & Rodríguez, 2014).

La fase de parásito, puede durar entre 18 a 22 días, esta inicia con la adhesión de la garrapata al hospedero; las larvas, se encuentran muy cerca del sitio en donde emergieron, tras la eclosión trepan por el pasto hasta alcanzar a un individuo para parasitarlo. Estas suelen ubicarse en partes donde la radiación solar casi no llega (papada, cuello, ingle, escroto, hombro, ubre, brazo, axila o vientre) (Bustillos & Rodríguez, 2014).

Por otra parte, en la fase no parasítica de *R. microplus* se distinguen las etapas detalladas en la tabla 2: *Fases de la etapa no parasítica o de vida libre de R. microplus*

**Tabla 8**

*Fases de la etapa no parasítica o de vida libre de R. microplus.*

| Factores       | Descripción   |
|----------------|---|
| Preoviposición | La hembra que se encuentra repleta, procede a desprenderse cayendo así al suelo y moviéndose en la búsqueda de un lugar con sombra para resguardarse y ovipositar. Duración: 2 a 4 días en verano y de 20 a 23 días en invierno.  |
| Oviposición    | Inicia con la puesta de huevos hasta que la hembra es ingurgitada. En esta fase, las condiciones ambientales influyen en los días de duración, puesto que suele tardar entre 5 a 15 días si se trata del verano; mientras que, en el invierno, la fase tiende a triplicar o duplicar su duración. |
| Incubación     | Esta fase engloba la puesta de huevos hasta su eclosión. Duración: 26 a 32 días en verano y 69 a 74 días en invierno. En este caso se requiere de una temperatura entre los 24,9 a 35°C y una Humedad relativa del 80 al 90%.   |

---

|                     |   |
|---------------------|---|
| Larva de vida libre | Luego de la eclosión, la larva se mantiene a la expectativa sobre el pasto, y se mueve evadiendo la radiación solar. Cuando se acerca un cuerpo suelen moverse más utilizando sus dos pares de patas traseras para arraigarse. Duración: 10 a 70 días en verano y hasta 250 días en lo que queda del año. Existen datos que estos parásitos pueden sobrevivir hasta 300 días. |
|---------------------|---|

---

Nota: La tabla presenta la descripción de las diferentes fases de la etapa móvil de *R. microplus*.

Adaptado de Bustillos Romo et al. (2014).

### **Patogenicidad y virulencia**

Específicamente, la patogenicidad es la cualidad o estado de patogenicidad, es decir la capacidad potencial que tiene un individuo para producir una enfermedad; mientras que la virulencia, es el poder atribuido a la producción de la enfermedad de un organismo, o a su vez, el grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie. La patogenicidad es un término cualitativo, un concepto de "todo o nada", mientras que la virulencia es un término que cuantifica la patogenicidad (Shapiro, Fuxa, Lacey, Onstad, & Kaya, 2005).

Para determinarlas es necesario realizar ensayos con los organismos vivos, para determinar parámetros como: el rango de los hospedantes, la virulencia, la competencia ecológica, las condiciones que incrementan o reducen la formación de la epizootia y las barreras de la infección (Berlanga & Hernández, 2006).

En consecuencia, el desarrollo de un bioensayo requiere del entendimiento del ciclo de vida tanto del patógeno, como del hospedante, caso contrario se pueden producir resultados inconsistentes. Otros factores que pueden influir en la viabilidad, la virulencia y la eficacia del hongo (conidios) son los métodos de la producción, una formulación adecuada, relacionadas al enriquecimiento del medio o sustratos de cultivo con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo y, su aplicación (Kruger, 2008).

## Capítulo III

### Metodología

#### *Ubicación del área de investigación*

##### Ubicación política

La investigación se realizó en la Estación Experimental Santo Domingo, INIAP; que se encuentra ubicada en Km 38 Vía Santo Domingo - Quinindé, Cantón La Concordia, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

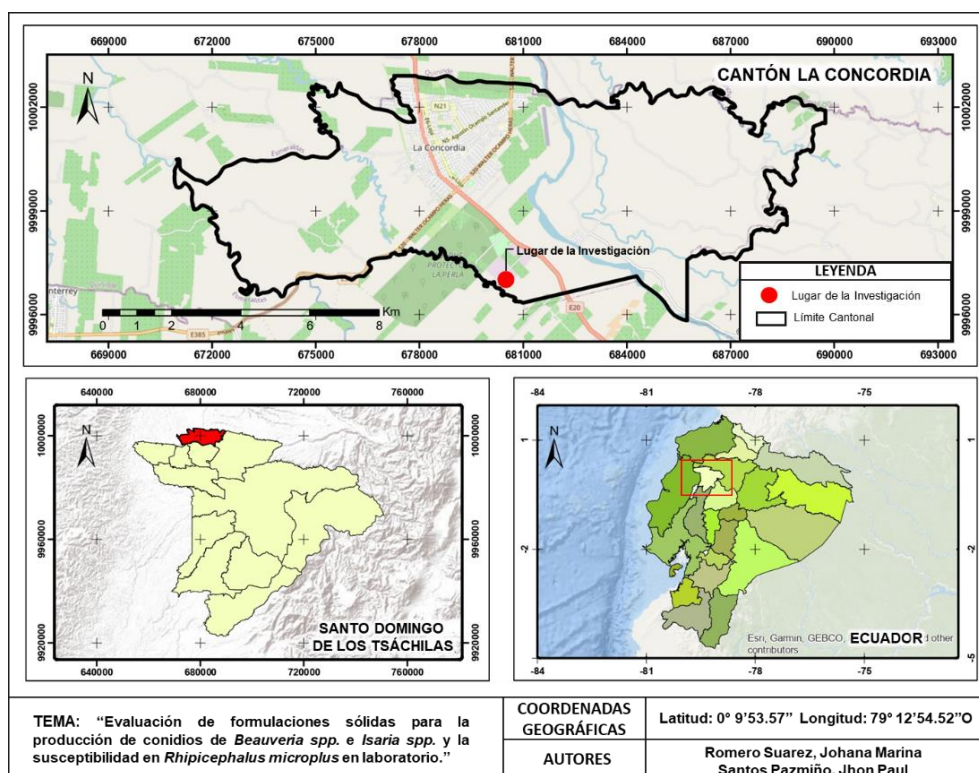
##### Ubicación geográfica

El estudio se llevó a efecto en las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: 0° 9' 53.57" S
- Longitud: 79° 12' 54.52" O

#### Figura 1

##### *Ubicación geográfica de la investigación*



Fuente: Romero & Santos (2022)



### Ubicación ecológica

La zona donde se realizó la investigación cuenta con las siguientes características ecológicas:

|                   |                                 |
|-------------------|---------------------------------|
| Zona de vida      | : Bosque húmedo Tropical (bh-T) |
| Altitud           | : 379 msnm                      |
| Temperatura media | : 24, 46° C                     |
| Precipitación     | : 3056,47 mm/año                |
| Humedad relativa  | : 87,94 %                       |
| Heliofanía        | : 699,50 hs luz/año             |
| Suelo             | : Franco arenoso                |

**Fuente:** Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) Estación La Concordia. Datos promedios de los años 2000–2014.

### Materiales

**Tabla 9**

*Materiales, equipos, insumos, reactivos y organismos del proceso investigativo.*

| Materiales de Laboratorio | Equipos                 | Insumos             | Reactivos               | Organismos  |
|---------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---|
| Cajas Petri               | Balanza                 | Agar Papa Dextrosa  | Tweem-20                |   |
| Botellas autoclavables    | Cámara de flujo laminar | Agar-Agar           | Cloranfenicol           | <i>Beauveria</i> spp. e <i>Isaria</i> spp.                              |
| Matraz de Erlenmeyer      | Microonda               | Arroz               | Ácido Láctico 25%       | (Cepas de la colección del Laboratorio de Producción vegetal, INIAP SD) |
| Vasos de precipitación    | Autoclave               | Cebada              | Azul de Lactofenol      |   |
| Probeta                   | Estufa                  | Harina de Palmiste  | Alcohol antiséptico 70% |   |
| Piseta                    | Agitador Vortex         | Harina de Quínoa    | Alcohol industrial 90%  |   |
| Jeringuillas              | Microscopio Óptico      | Levadura de cerveza | Agua destilada estéril  |   |
| Asa Drigalsky             | Esteroscopio            | Leche en Polvo      |                         |   |
| Funda de Polipropileno    | Destilador de agua      |                     |                         |   |
| Porta y cubre objetos     | Computadora             |                     |                         |   |

Cámara de Neubauer      Calculadora  
 Gradillas                      Cámara  
     fotográfica  
 Micropipetas  
 Puntas de pipetas  
 plásticas  
 Tubos de ensayo  
 Mechero de alcohol  
 Papel toalla  
 Pinzas  
 Parafilm  
 Papel de aluminio  
 Cinta adhesiva  
 Algodón  
 Gasa

---

## **Métodos**

### **Diseño experimental**

#### **Factores**

Los factores probados en la investigación fueron dieciocho formulaciones para la producción de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp,

#### **Tabla 10**

*Factores y niveles propuestos en la evaluación de formulaciones sólidas para la producción de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp.*

| <b>Factores</b> | <b>Niveles</b> | <b>Descripción</b>                     |
|-----------------|----------------|--|
| Formulación     | f1             | Arroz 100%                             |
|                 | f2             | Arroz 97,5% + Harina de palmiste 2,5%  |
|                 | f3             | Arroz 95% + Harina de palmiste 5%      |
|                 | f4             | Arroz 97,5% + Harina de quinua 2,5%    |
|                 | f5             | Arroz 95% + Harina de quinua 5%        |
|                 | f6             | Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% |

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
|                      | f7  | Arroz 95% + Levadura de cerveza 5%      |
|                      | f8  | Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5%       |
|                      | f9  | Arroz 95% + Leche en polvo 5%           |
|                      | f10 | Cebada 100%                             |
|                      | f11 | Cebada 97,5% + Harina de palmiste 2,5%  |
|                      | f12 | Cebada 95% + Harina de palmiste 5%      |
|                      | f13 | Cebada 97,5% + Harina de quinua 2,5%    |
|                      | f14 | Cebada 95% + Harina de quinua 5%        |
|                      | f15 | Cebada 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% |
|                      | f16 | Cebada 95% + Levadura de cerveza 5%     |
|                      | f17 | Cebada 97,5% + Leche en polvo 2,5%      |
|                      | f18 | Cebada 95% + Leche en polvo 5%          |
| Hongo Entomopatógeno | h1  | <i>Beauveria</i> spp.                   |
|                      | h2  | <i>Isaria</i> spp.                      |

Nota: Esta tabla muestra los factores y niveles evaluados en la investigación.

### **Tratamientos**

A continuación, se presentan los tratamientos de la investigación.

**Tabla 11**

*Tratamientos planteados para evaluación de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp.*

| <b>Trat.</b> | <b>Código</b> | <b>Descripción del tratamiento</b>                             |
|--------------|---------------|--|
| T1           | f1*h1         | Arroz 100% + <i>Beauveria</i> spp.                             |
| T2           | f2*h1         | Arroz 97,5% + Harina de palmiste 2,5% + <i>Beauveria</i> spp.  |
| T3           | f3*h1         | Arroz 95% + Harina de palmiste 5% + <i>Beauveria</i> spp.      |
| T4           | f4*h1         | Arroz 97,5% + Harina de quinua 2,5% + <i>Beauveria</i> spp..   |
| T5           | f5*h1         | Arroz 95% + Harina de quinua 5% + <i>Beauveria</i> spp.        |
| T6           | f6*h1         | Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + <i>Beauveria</i> spp. |
| T7           | f7*h1         | Arroz 95% + Levadura de cerveza 5% + <i>Beauveria</i> spp.     |
| T8           | f8*h1         | Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5% + <i>Beauveria</i> spp.      |
| T9           | f9*h1         | Arroz 95% + Leche en polvo 5% + <i>Beauveria</i> spp.          |
| T10          | f10*h1        | Cebada 100% + <i>Beauveria</i> spp.                            |

|     |        |   |
|-----|--------|---|
| T11 | f11*h1 | Cebada 97,5% + Harina de palmiste 2,5% + <i>Beauveria</i> spp.  |
| T12 | f12*h1 | Cebada 95% + Harina de palmiste 5% + <i>Beauveria</i> spp.      |
| T13 | f13h1  | Cebada 97,5% + Harina de quinua 2,5% + <i>Beauveria</i> spp.    |
| T14 | f14*h1 | Cebada 95% + Harina de quinua 5% + <i>Beauveria</i> spp.        |
| T15 | f15*h1 | Cebada 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + <i>Beauveria</i> spp. |
| T16 | f16*h1 | Cebada 95% + Levadura de cerveza 5% + <i>Beauveria</i> spp.     |
| T17 | f17*h1 | Cebada 97,5% + Leche en polvo 2,5% + <i>Beauveria</i> spp.      |
| T18 | f18*h1 | Cebada 95% + Leche en polvo 5% + <i>Beauveria</i> spp.          |
| T19 | f1*h2  | Arroz 100% + <i>Isaria</i> spp.                                 |
| T20 | f2*h2  | Arroz 97,5% + Harina de palmiste 2,5% + <i>Isaria</i> spp.      |
| T21 | f3*h2  | Arroz 95% + Harina de palmiste 5% + <i>Isaria</i> spp.          |
| T22 | f4*h2  | Arroz 97,5% + Harina de quinua 2,5% + <i>Isaria</i> spp.        |
| T23 | f5*h2  | Arroz 95% + Harina de quinua 5% + <i>Isaria</i> spp.            |
| T24 | f6*h2  | Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + <i>Isaria</i> spp.     |
| T25 | f7*h2  | Arroz 95% + Levadura de cerveza 5% + <i>Isaria</i> spp.         |
| T26 | f8*h2  | Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5% + <i>Isaria</i> spp.          |
| T27 | f9*h2  | Arroz 95% + Leche en polvo 5% + <i>Isaria</i> spp.              |
| T28 | f10*h2 | Cebada 100% + <i>Isaria</i> spp.                                |
| T29 | f11*h2 | Cebada 97,5% + Harina de palmiste 2,5% + <i>Isaria</i> spp.     |
| T30 | f12*h2 | Cebada 95% + Harina de palmiste 5% + <i>Isaria</i> spp.         |
| T31 | f13*h2 | Cebada 97,5% + Harina de quinua 2,5% + <i>Isaria</i> spp.       |
| T32 | f14*h2 | Cebada 95% + Harina de quinua 5% + <i>Isaria</i> spp.           |
| T33 | f15*h2 | Cebada 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + <i>Isaria</i> spp.    |
| T34 | f16*h2 | Cebada 95% + Levadura de cerveza 5% + <i>Isaria</i> spp.        |
| T35 | f17*h2 | Cebada 97,5% + Leche en polvo 2,5% + <i>Isaria</i> spp.         |
| T36 | f18*h2 | Cebada 95% + Leche en polvo 5% + <i>Isaria</i> spp.             |

---

Nota: Esta tabla muestra los tratamientos y códigos evaluados en la investigación.

### ***Tipo de diseño***

El diseño usado en la investigación fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo bifactorial, cada tratamiento constó de cuatro repeticiones.

## Análisis estadístico

### Esquema del análisis de varianza

A continuación, se presenta el esquema de análisis de varianza de la investigación.

**Tabla 12.**

*Esquema del análisis de varianza.*

| Fuente de variación            | Grados de libertad |
|--------------------------------|--------------------|
| Factor A: Formulación          | 17                 |
| Factor B: Hongo Entomopatógeno | 1                  |
| Factor A*Factor B              | 17                 |
| Error experimental             | 108                |
| Total                          | 143                |

### Coefficiente de variación

Para determinar el coeficiente de variación se utilizó la siguiente ecuación:

$$cv = \frac{\sqrt{CM_e}}{\bar{x}} \times 100$$

Dónde;

$cv =$  Coeficiente de variación

$CM_e =$  Cuadrado medio del error

$\bar{x} =$  Media general del experimento

### Análisis funcional

Los datos obtenidos fueron procesados de acuerdo a los siguientes análisis estadísticos.

- Análisis de la Varianza (ADEVA).
- Prueba de Tukey para la separación de medias.
- Niveles de significancia  $\alpha \leq 0,05$   $\alpha \leq 0,01$ .

## **Variables medidas**

### **Germinación de conidios (%)**

Para determinar el porcentaje de conidios germinados, se recolectó cuatro muestras de sustrato sólido por tratamiento, cada muestra fue equivalente a 1 g, la primera muestra se obtuvo de la parte superior derecha de la bolsa, la segunda muestra de la parte superior izquierda, la tercera de la parte central y la última de la parte inferior. Luego a cada muestra se realizó diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ), para ello se agregaron 9 mL de ADE a siete tubos de ensayo, se vertió la muestra al primer tubo de ensayo y se agitó en el vortex por 1min; a continuación, con la micropipeta se tomó 1000  $\mu$ L del primer tubo y se depositaron al siguiente tubo, se repite el proceso hasta llegar a la dilución  $10^{-7}$ .

Una vez obtenidas las diluciones se sembraron 20  $\mu$ L de la dilución  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  en Agar-Agar temperado en cinco puntos de la caja Petri, se realizó tres cajas por dilución. Se incubó las muestras a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante dieciséis horas.

Una vez terminado el periodo de tiempo se adicionaron una alícuota de Azul de Lactofenol, en cada punto del medio de cultivo, a fin de teñir los conidios y detener el proceso de germinación. Para el conteo se cortó un cuadrado de Agar agua coloreado de aproximadamente  $1\text{ cm}^2$  y se colocó en una lámina porta objetos, en seguida se cubrió la muestra con una lámina cubre objeto, se observó al microscopio en Lente 40x, de esta manera se procedió a realizar el conteo 300 conidios en total por muestra (germinados y no germinados). Se registraron los datos obtenidos según la dilución sembrada.

Para calcular el porcentaje de germinación de los hongos entomopatógenos se utilizó la siguiente fórmula (Berlanga & Herrera, 2006).

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Total de conidios evaluados}} \times 100$$

### **Concentración de conidios**

Para la determinación del número de conidios/g, se tomó 25  $\mu\text{L}$  de la dilución seleccionada ( $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ ) y se la transfirió a la cámara de Neubauer, hasta que por capilaridad se llene un lado de la cámara. Se dejó en reposo por un minuto; a continuación, se montó la cámara Neubauer en el microscopio y se contó los conidios en el Lente 40x. Para el conteo se usó el cuadrante central; de los 25 cuadrantes de  $0,2 \text{ mm}^2$  se seleccionó cinco, uno de cada vértice y uno del centro, teniendo en cuenta que cada cuadrante tiene 16 cuadros de  $0,0025 \text{ mm}^2$ . Durante la lectura se siguió un orden lógico, considerando los conidios que sobresalgan en el margen superior y el margen izquierdo.

Suponiendo que si en el cuadrante de conteo existen  $\leq 20$  conidios, se contará en la dilución anterior, en caso de existir un cuadrante  $\geq 100$  conidios, se contará en la siguiente dilución (Báez, et al., 2019).

La fórmula de estigmatización es la siguiente:

$$\text{Concentración de conidios (g)} = \bar{X} \times 25 \times 10\,000 \times FD$$

Donde,

$\bar{X}$  : Promedio de las lecturas por área de conteo de la cámara de Neubauer

**FD:** Factor de dilución (inverso de la dilución cuantificada)

**25 y 10 000:** constantes para cuadrante central

### **Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC)**

En la determinación del número de propágulos microbianos viables, se trabajó con las diluciones  $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ , obtenidas de la medición de la primera variable de la muestra. Se tomó 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución y se sembró en cajas Petri con PDA. A continuación, se distribuyó la muestra por toda la superficie usando un asa Drigalsky. Se incubó las muestras de manera invertida a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 días; de acuerdo a cada dilución se realizó el conteo; teniendo en cuenta que la estimación para hongos es de 10 a 100 colonias.

Para realizar el cálculo de UFC se usó la siguiente fórmula propuesta por (Báez, et al., 2019):

$$\text{Viabilidad / Concentración del bioinsumos} \left( \frac{\text{UFC}}{g} \right) = P \times FD$$

Donde,

**P:** Promedio del número de colonias en las tres cajas de la dilución seleccionada

**FD:** Factor de la dilución (inverso) de la dilución rotulada en la caja Petri

### **Porcentaje de Pureza (Unidades Formadoras de Colonias, UFCs)**

Para la determinación del porcentaje de pureza de cada tratamiento, se procedió a sembrar por triplicado 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , se incubó por 5 días, después se realizó el conteo de colonias de microorganismos contaminantes de cada dilución, donde se encuentre 10 a 100 colonias por cajas. Para calcular la concentración del contenido de contaminantes se siguió la fórmula para UFC planteada por Berlanga & Hernández (2006).

El porcentaje de pureza (P), se calculará con la fórmula siguiente:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{[MOB]}{[MOB] + [MOC]} \times 100$$

**MOB:** Microorganismos benéficos

**MOC:** Microorganismos contaminantes

Se considera que un producto comercial debe poseer un porcentaje de pureza superior al 90%. Los microorganismos contaminantes permisibles no deben causar daño a la salud humana, animal, vegetal ni al ambiente (Báez, et al., 2019).

### **Métodos específicos de manejo del experimento**

#### **Labores de Laboratorio.**

#### **Producción de blastosporas para el cultivo**

Las cepas de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. se descongelaron por 45 min a temperatura ambiente y se cultivaron en Agar Papa Dextrosa (PDA) con 2,5 g de Cloranfenicol en 1 L de ADE. Las cajas se incubaron durante 14 días a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .



### ***Preparación de los formulaciones***

Se utilizó arroz (*Oryza sativa L.*) y cebada (*Hordeum vulgare L*) como sustratos base, se retiraron las impurezas, mediante un lavado con agua corriente por 2 min, respectivamente. A continuación, se dejaron escurriendo por 10 min sobre malla de polietileno de alta densidad de 0,28 mm de espesor. Una vez seco, se pesaron los sustratos bases en bolsas de polietileno de alta densidad (PEAD) de 27x 22 cm. A continuación, se agregarán los suplementos (Harina de palmiste, Harina de quinua, Levadura de cerveza, Leche en polvo), de acuerdo a las formulaciones que constituyen 100 g, posteriormente se adicionó agua destilada estéril para lograr la humedad deseada, en aditivos en polvo 5 mL de ADE y en aditivos pastosos 3 mL de ADE. Las bolsas fueron selladas con grapas metálicas y esterilizadas en una autoclave automática a 121 °C, 15PSI por 20 min.

### ***Inoculación de los sustratos***

Las bolsas se dejaron enfriar durante 2 h, posteriormente se las trasladó a la cámara de flujo laminar, en donde se realizó un raspado de tres cajas Petri del cultivo puro de hongos entomopatógenos y se diluyeron en una solución de un litro de Tween-20 al 0,1%. Las bolsas con arroz fueron inoculadas aplicando 5 mL de solución madre y en cebada con 5 mL de solución madre más 10 mL ADE. Posteriormente se incubaron durante 14 días en un cuarto oscuro a temperatura ambiente ( $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y una humedad relativa del 90%. Las bolsas se las agitó cada cinco días para esparcir los conidios homogéneamente. Luego se las trasladó al cuarto de secado y se las distribuyó en bandejas de plástico; permanecieron en esta área por 15 días. Al final del tiempo de crecimiento se determinó las variables de estudio.

### ***Prueba de susceptibilidad en Garrapatas***

Las garrapatas se extrajeron manualmente con pinzas en estado de telogina, revisando la totalidad de bovinos en el establecimiento. Posteriormente se las trasladó al laboratorio, donde se las dispuso en cajas Petri, que contendían algodón humedecido. La incubación tuvo

una duración de 14 días y se controló las condiciones climáticas: 27°C, 85-90% HR y 12 hs luz. Cumplido este período de tiempo de ovipostura se colocó 100 huevos de garrapatas en tubos de ensayo de 1,5 cm de diámetro. A estos tubos de ensayo previamente se les agregó 2 mL de agua destilada seguido de algodón a presión. Se monitorearon los huevos hasta detectar su eclosión. Cuando las larvas tuvieron entre 14 a 21 días de eclosionadas se realizó la prueba de susceptibilidad, para su efecto se tomó 1 g de cada Bioproducto y se realizaron diluciones hasta llegar a la  $10^{-3}$ , la cual fue utilizada para la aplicación directa en larvas, se aspergeo 1,5 mL de *Beauveria* spp. por caja Petri. Se trabajó con tres repeticiones por tratamiento de bioformulado al cabo de 9 días se registró el porcentaje de mortalidad de cada tratamiento.

### ***Análisis costo/beneficio***

El costo-beneficio (B/C) también es conocido como índice neto de rentabilidad y su valor se obtiene al dividir el Valor Actual de los Ingresos Totales Netos o beneficios netos (VAN) entre el Valor Actual de los Costos de inversión o costos totales (VAC).

La fórmula es de la siguiente manera:

$$\text{Costo/beneficios} = \frac{\text{Beneficios netos}}{\text{Costos de inversión}} = \text{Valor de costo/beneficio}$$

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

### Germinación de conidios (%)

El análisis de varianza para la germinación de conidios de las cepas de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. a las 16 h (Tabla 13), presentó diferencias altamente significativas para el factor A y el factor B ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ), de igual forma existió diferencias altamente significativas en la interacción de los dos factores ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ).

**Tabla 13**

*Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.*

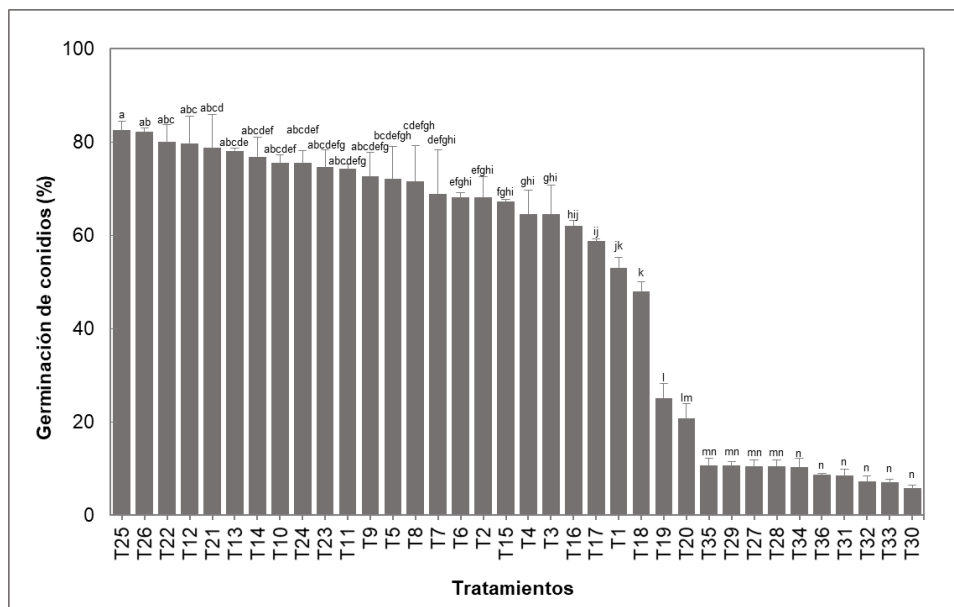
| Fuentes de variación           | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | FC     | p-valor |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------|---------|
| Factor A: Formulación          | 39149,46          | 17                 | 2,30E+03       | 166,12 | <0,0001 |
| Factor B: Hongo Entomopatógeno | 41864,67          | 1                  | 4,19E+04       | 3019,9 | <0,0001 |
| Factor A*Factor B              | 40519,7           | 17                 | 2,38E+03       | 171,93 | <0,0001 |
| Error                          | 1497,2            | 108                | 1,39E+01       |        |         |
| Total                          | 123031,02         | 143                |                |        |         |
| CV                             |                   | 7,31               |                |        |         |

Nota. Coeficiente de variación experimental 7,31%.

Los tratamientos que presentaron los mayores porcentajes de germinación de conidios, de acuerdo a la figura 2, fueron: T25 (Arroz 95% + Levadura de cerveza 5% + *Isaria* spp.) con un 82,5%, T26 (Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5% + *Isaria* spp) con un 82,1% y T22 (Arroz 97,5% + Harina de quinua 2,5% + *Isaria* spp.) con un 80%. Los tratamientos con menores porcentajes de germinación fueron: T30 (Cebada 95% + Harina de palmiste 5% + *Isaria* spp.) con un 5,9%, T33 (Cebada 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + *Isaria* spp.) con 7% y T32 (Cebada 95% + Harina de quinua 5% + *Isaria* spp.) con un 7,2%.

**Figura 2.**

Porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. en diferentes formulaciones sólidas.



Nota. Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%. Líneas en las barras indican el error estándar.

De acuerdo a Vélez et al. (1997) una formulación comercial debe tener un porcentaje de germinación  $\geq 85\%$  en un tiempo de incubación de 24 h, a pesar de que este parámetro de calidad microbiológica fue evaluada a las 16 h, se obtuvo porcentaje  $\leq 82,5\%$ , de modo que se logró reducir el tiempo del proceso germinativo de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. y se demuestra alta viabilidad de conidios. El bio-insumo debe garantizar un alto porcentaje de germinación puesto que, al realizar la aplicación en campo, el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto a controlar y un corto periodo de exposición a condiciones ambientales (Chiriboga, Gómez, & Garcés, 2015). Por otro lado, la germinación de *Isaria* spp. en cebada más suplementos cayó súbitamente con porcentajes inferiores al 10,8%, debido al alto contenido de fitocistatinas en la cebada. Carrillo (2009) afirma que la ingestión de altas concentraciones de fitocistatinas provoca la muerte celular programada y se ha demostrado

que actúan como proteínas de defensa frente a plagas y patógenos, por lo que puede ser una de las razones que inhibió la germinación de *Isaría* spp.

### Concentración de conidios

La concentración de conidios (conidios/g) de los tratamientos se calculó con el promedio de la lectura del cuadrante central de la cámara de Neubauer, según la Tabla 14, el coeficiente de variación obtenido fue del 3,55% siendo menor a 25% *in vitro*; por lo tanto, reflejan la ausencia de datos atípicos y garantiza que se llevo a cabo una buena recopilación de datos. El análisis de varianza indica una diferencia significativa con un (F.calc= 2011.68; p-valor= 0,0001) para la interacción del factor A\*factor B, siendo el p-valor menor. El criterio de significancia fue  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

**Tabla 14**

*Análisis de varianza para la concentración de conidios de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.*

| Fuentes de variación           | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | FC       | p-valor |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|----------|---------|
| Factor A: Formulación          | 6,65E+19          | 17                 | 3,84E+18       | 1985,12  | <0,0001 |
| Factor B: Hongo Entomopatógeno | 1,05E+20          | 1                  | 1,05E+20       | 53993,70 | <0,0001 |
| Factor A*Factor B              | 6,62E+19          | 17                 | 3,90E+18       | 2011,68  | <0,0001 |
| Error                          | 2,09E+17          | 108                | 1,94E+15       |          |         |
| Total                          | 2,36E+20          | 143                |                |          |         |
| CV                             |                   | 3,55               |                |          |         |

Nota. Coeficiente de variación experimental 3,55%.

En la prueba de calidad sobre la concentración de conidios, mostró que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Figura 3). El conteo mostró una mayor concentración de conidios en el T6 cuya formulación fue Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5% + *Beauveria* spp. a una concentración de  $6,9 \times 10^9$  conidios/g, en comparación a las demás. Seguida del T16, cuya formulación fue Cebada 95% + Levadura de cerveza 5% +

*Beauveria* spp. a una concentración superior a  $2,9 \times 10^9$  conidios/g, la formulación con menor concentración para *Beauveria* spp. fue el T8 (Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5%) a una concentración de  $7,2 \times 10^8$  conidios/g. Para *Isaria* spp. la mayor concentración estuvo representada por el T34 (Cebada 95% + Levadura de cerveza 5%) a una concentración de  $1,3 \times 10^9$  conidios/g, seguida del T31 (Cebada 97,5% + Harina de quinua 2,5%) a una concentración de  $8,2 \times 10^8$  conidios/g y la menor concentración fue de  $4,6 \times 10^7$  conidios/g para el T23 (Arroz 95% + Harina de quinua 5%).

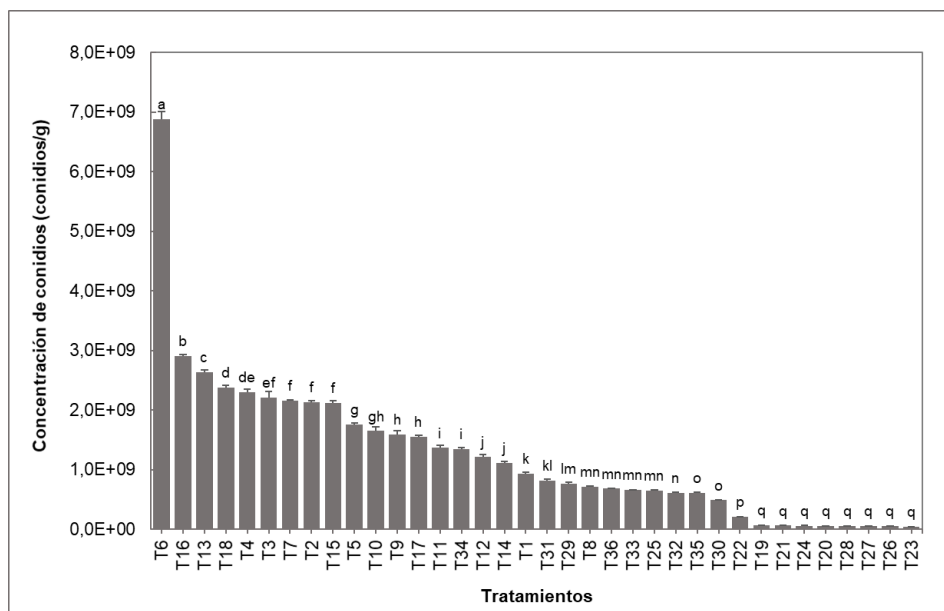
Según Gómez et al. (2014) un bio-insumo a base de *B. bassiana* debe tener una concentración de conidios/g  $\geq 10^{10}$ , para estar apto para ser utilizado en campo, normativa establecida por SENASA. Los tratamientos propuestos no lograron superar esta concentración, no obstante, el T6 (Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5%) fue 7,4 veces mayor con respecto al T1 (Arroz 100%), que es el sustrato generalmente utilizado para la producción de conidios aéreos de hongos entomopatógenos, ya que este posee condiciones físicas adecuadas como: consistencia suave, suelta, sin aglomeración, esto favorece el crecimiento micelial y homogéneo del hongo en el sustrato (Grabowski, Orrego, & Stauffer, 2005). Es importante destacar los aportes nutricionales del arroz como el 78,9% de carbohidratos y micro y macronutriente (Fe, P, Cu, Zn) en diferentes concentraciones (Tabla 2). Por otro lado, la levadura de cerveza incrementó la producción de conidios por gramo, tanto en *Beauveria* spp. como *Isaria* spp. (Figura 4), los resultados son contradictorios a lo reportado por Grabowski et al. (2005) que indican que la levadura inhibe la concentración de conidios a  $2,64 \times 10^6$  conidios/g. Sin embargo, Mata (2008) al usar extracto de levadura para la producción de *B. bassiana* en un proceso fermentativo, logró incrementar la proliferación a razón de  $2,77 \times 10^8$  conidios/ml, esto por alto contenido de nitrógeno que posee la levadura.

Por su parte, la producción de conidios de *Isaria* spp en el sustrato cebada más levadura de cerveza al 5% fue 29 veces mayor con respecto arroz 100%, según el reporte de Figueroa et al. (2007) “La cebada fue el sustrato que mostró la mayor productividad con una

concentración de  $2,19 \times 10^{10}$  conidios/g frente al sustrato convencional (arroz) con una concentración de  $6,94 \times 10^9$  conidios/g". Esto debido al alto contenido de carbohidratos, nitrógeno, micronutrientes, vitaminas del complejo B y alta concentración de iones necesarios para el crecimiento, esporulación (Volcy & Pardo, 1994).

### Figura 3

Concentración de conidios de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. en diferentes formulaciones sólidas



Nota. Producción promedio de conidios entre diferentes tratamientos evaluados a los 30 días de incubación. Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%. Líneas en las barras indican el error estándar.

La variabilidad en la producción de conidios entre las diferentes formulaciones evaluadas en investigaciones previas y actuales, manifiestan que el rendimiento de conidios por gramo se ve influenciado por la cepa y por el estado de la misma, pudiendo variar entre  $5 \times 10^3$  y  $2.5 \times 10^{11}$  conidios/g de sustrato (Monzón, 2001).

### Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC)

La determinación de viabilidad/concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) de los diversos tratamientos se efectuó bajo criterio de selección de cajas Petri con

diluciones que oscilaban entre 10 a 100 colonias de hongos entomopatógenos. Según la Tabla 15, el coeficiente de variación obtenido fue del 18,01% siendo menor a 25% *in vitro*; por lo tanto, reflejan la ausencia de datos atípicos y garantiza que se llevo a cabo una buena recopilación de datos. El análisis de varianza indica una diferencia significativa con un (F.calc= 695,41; p-valor= 0,0001) para la interacción del factor A\*factor B, siendo el p-valor menor. El criterio de significancia fue  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

**Tabla 15**

*Análisis de varianza para la Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC) de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.*

| Fuentes de variación           | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | FC      | p-valor |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------|---------|
| Factor A: Formulación          | 1,153E+21         | 17                 | 6,78E+19       | 683,02  | <0,0001 |
| Factor B: Hongo Entomopatógeno | 3,644E+20         | 1                  | 3,64E+20       | 3670,91 | <0,0001 |
| Factor A*Factor B              | 1,173E+21         | 17                 | 6,90E+19       | 695,41  | <0,0001 |
| Error                          | 1,072E+19         | 108                | 9,93E+16       |         |         |
| Total                          | 2,701E+21         | 143                |                |         |         |
| CV                             |                   | 18,01              |                |         |         |

Nota. Coeficiente de variación experimental 18,01%.

En la prueba de calidad (UFC) con la información brindada en la Figura 4, demostraron tener diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Prueba de Tukey). El conteo luego de los cinco días mostró el número de UFC/g, de manera que el tratamiento con el mayor número de UFC corresponde al T6, con una concentración  $2,64 \times 10^{10}$  UFC/g, seguido del T18 con una concentración  $3,92 \times 10^9$  UFC/g, el tratamiento con menor rendimiento corresponde al T8 con una concentración  $5,78 \times 10^8$  UFC/g, para *Beauveria* spp. Mientras para *Isaria* spp. el mejor tratamiento correspondió al T33 con una concentración  $3,69 \times 10^8$  UFC/g, seguido del T28 con una concentración  $3,60 \times 10^8$  UFC/g, el tratamiento con menor concentración correspondió al T23 con una concentración  $2,68 \times 10^7$  UFC/g.

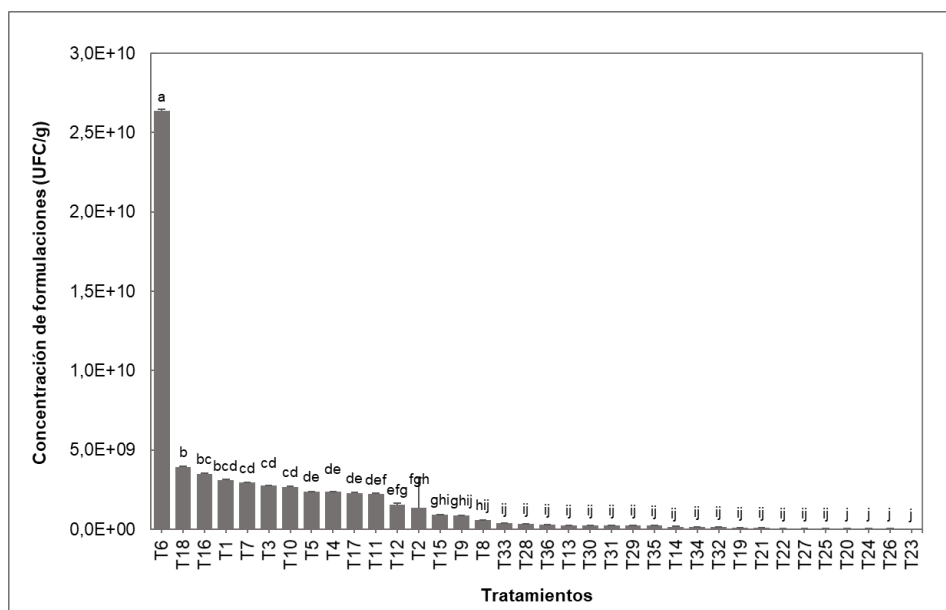


Según Noboa & Quelal (2015), utilizando el sustrato convencional (arroz), obtuvieron concentraciones a razón de  $1,43 \times 10^8$  UFC/g, en contraste con los resultados obtenidos en la presente investigación, se logró maximizar la concentración de UFC/g en un 99,5% con el tratamiento T6.

El rendimiento de la esporulación sobre un sustrato dependerá directamente de factores como: técnica de cultivo, concentración del inóculo inicial, condiciones de temperatura, humedad, aireación, y tiempo de incubación, así como las por diferencias nutricionales entre los sustratos (Roberts & Yendol, 1971).

#### Figura 4

*Concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC) de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.*



Nota. Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%. Líneas en las barras indican el error estándar.

#### Porcentaje de Pureza (Unidades Formadoras de Colonias, UFCs)

El Porcentaje de Pureza (%) se determinó a partir de concentración de los microorganismos contaminantes y el biocontrolador. Conforme al recuento porcentual de las colonias contaminantes, el ANOVA arrojó un coeficiente de variación de 4,58% siendo menor a

25% (Tabla 16); por tanto, se afirma la ausencia de datos atípicos. Además, no existió diferencia significativa para la interacción del Factor A\* Facto B con un (F. calculado = 0,74; p-valor= 0,75), el valor  $p$  fue mayor que el criterio de significancia  $\alpha = 0,05$ , por tanto, se rechazó la hipótesis alternativa y se aceptó la hipótesis nula.

**Tabla 16**

*Análisis de varianza para el porcentaje de pureza de UFC de Beauveria spp. e Isaria spp. en diferentes formulaciones sólidas.*

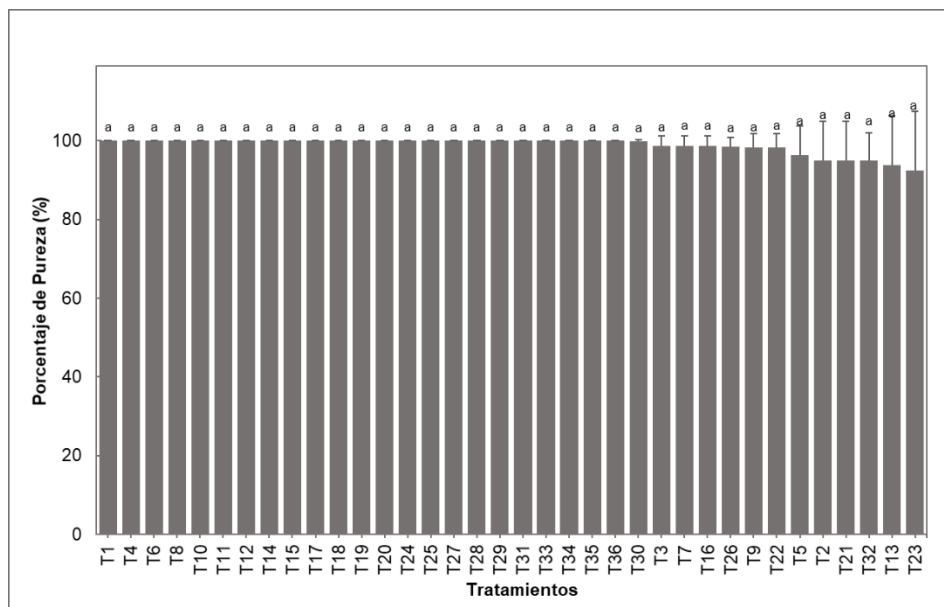
| Fuentes de variación           | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | FC     | p-valor |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------|---------|
| Factor A: Formulación          | 341,14            | 17                 | 20,07          | 0,98   | 0,4851  |
| Factor B: Hongo Entomopatógeno | 0,03              | 1                  | 0,03           | 0,0014 | 0,9707  |
| Factor A*Factor B              | 257,47            | 17                 | 15,15          | 0,74   | 0,7554  |
| Error                          | 2210              | 108                | 20,46          |        |         |
| Total                          | 2808,64           | 143                |                |        |         |
| CV                             |                   | 4,58               |                |        |         |

Nota. La variabilidad del porcentaje de pureza es inherente al manejo del experimento en laboratorio.

De acuerdo a la Figura 5, los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas. Esto concuerda con la investigación realizada por Zambrano et al. (2015), en la cual se evaluó *Beauveria* spp. para control de *Varroa* (destructor parásito de la abeja melífera), y se observó porcentajes de pureza del hongo en un rango de 89-100% en cajas Petri. Así mismo, Uribe (1997) menciona que “Las formulaciones comerciales deben tener un porcentaje de pureza superior al 90%” (pág. 14), para evitar efectos negativos en el tiempo de vida útil del ingrediente activo, pérdida de eficiencia y/o alteración de las propiedades físicoquímicas del bio-insumo (Berlanga & Herrera, 2006). Por consiguiente, los tratamientos evaluados cumplieron con este parametro de calidad microbiológica.

### Figura 5

Porcentaje de pureza de UFC de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. en diferentes formulaciones sólidas.



Nota. Letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 5%. Líneas en las barras indican el error estándar.

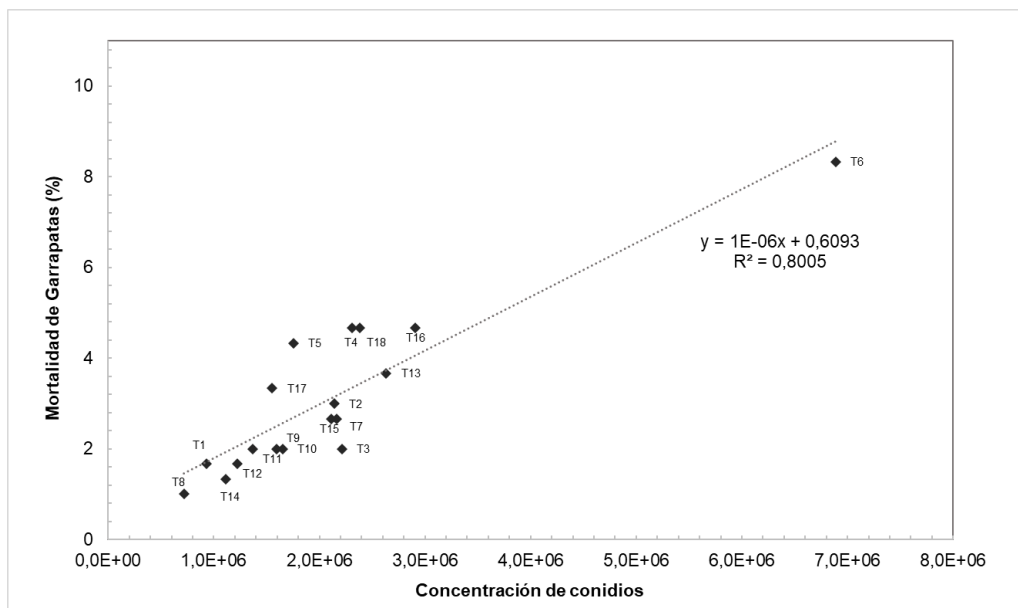
### Pruebas de susceptibilidad en *R. microplus*

La mortalidad de las larvas de *R. microplus* sometidas a los 18 tratamientos fue evaluada a los 9 días. De acuerdo a la figura 6, existe una correlación positiva ( $r=0,89$ ) para la susceptibilidad de *R. microplus*, ya que la mortalidad de las garrapatas aumenta significativamente con la concentración de conidios de *Beauveria* spp. El porcentaje más alto de mortalidad de *R. microplus* (*in vitro*) fue de 8,3% en el día 9 postratamiento para el T6 (Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5%) a una concentración de  $6,9 \times 10^6$  conidios/mL, esta relación no es significativa en comparación con los resultados obtenidos por Tofiño et al (2018), donde *B. bassiana* controló efectivamente a *R. microplus* en estadio adulto a concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL, ocasionando una mortalidad del 100% en garrapatas en el día 7 postratamiento, mientras que a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml obtuvo una mortalidad

del 90% en el día 10 postratamiento. La baja tasa de mortalidad respondió a la falta de reactivación de la cepa antes de su uso en producción masiva (Berlanga & Hernández, 2006).

### Figura 6

*Interacción de la concentración de conidios de Beauveria spp. de diferentes formulaciones frente al porcentaje de mortalidad de larvas de R. microplus.*



Nota. Existe una tendencia lineal de los datos, a mayor concentración de conidios, mayor porcentaje de germinación.

Anteriores estudios demuestran que la reactivación del hongo entomopatógeno sobre el insecto, mejora y potencia la capacidad patogénica del aislamiento de *Beauveria* spp. Valdés et al. (1998) mencionan que la respuesta enzimática del aislamiento de *B. bassiana* aumenta cuando este es reactivado en el insecto plaga, la previa interacción del hongo con los componentes de la cutícula genera una mayor capacidad de control, puesto que existe una coevolución entre el patógeno y su hospedante, dada en un largo periodo de tiempo y producida en la superficie cuticular (Fargues & Remaudiere, 1977). Esa interacción adaptativa hace que el biocontrolador exprese sistemas enzimáticos y mecánicos específicos hacia los componentes que conforman la cutícula del insecto, al igual que ciertas respuestas adaptativas

hacia el hospedero tal como: una mayor germinación, penetración, producción de metabolitos secundarios y resistencia a los compuestos antifúngicos.

### **Análisis Costo-Beneficio**

Para considerar un sustrato como idóneo a los fines de la producción de conidios de una cepa o aislado de un hongo entomopatógeno debe tomarse en cuenta su bajo costo, fácil adquisición, alta concentración de conidios/g y capacidad para mantener la virulencia de la cepa (Roberts & Yendol, 1971).

El precio de comercialización de 800 g de un Bio-insumo a base de hongos entomopatógenos, en el cual se garantizan una concentración superior a  $1 \times 10^{10}$  conidios/g, por parte de la Entidad "SENASA" en el año 2017 tuvo un coste referencial de S/.13,32 (\$ 3,42), dicho valor esta sujeto a la volatilidad de la moneda. Actualmente la empresa "Productos Biológicos para la agricultura PBA", comercializan el producto YURAK G (Sustrato granulado *B. bassiana*) a S/.16,95 (\$ 4,36), que tiene una concentración  $>2,5 \times 10^9$  conidios/g (AgroBesser, 2022), lo que evidencia los costos de venta con respecto al periodo de tiempo en conjunto con la volatilidad monetaria.

De acuerdo a la Tabla 17, el T6 representó una ganancia de \$ 2,10, por cada dólar invertido, asumiendo que la concentración de conidios/g fue superior a  $3 \times 10^9$ , seguido del T2 con una relación Costo-Beneficio de \$ 1,44. A pesar de que T16 alcanzó la segunda mejor concentración/g (Figura 3) de acuerdo al análisis de relación Costo-Beneficio se postuló en el décimo lugar con \$ 0,78. Es necesario aclarar que se adquirió la cebada a \$1,32/Kg, si se acorta la red de suministro se podría reducir el costo por debajo de \$0,52/Kg (Sinagap, 2022). La reducción de los costos de materia prima, puede incrementar los beneficios y/o rentabilidad económica.

Después de haber realizado el presupuesto parcial con el hongo *Isaria* spp. para identificar los costos variables de los tratamientos evaluados (Tabla 18). La implementación de

los tratamientos no se puede llevarse a efecto, dado que ninguno de los tratamientos con el hongo *Isaria* spp. no tienen una producción viable tanto biológica como económica.

**Tabla 17.**

*Análisis Costo-Beneficio de las formulaciones a base de Beauveria spp.*

| Rubro                                | Unidad     | Tratamientos |             |             |             |             |             |             |              |             |              |              |              |             |              |             |             |              |             |      |
|--------------------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------|
|                                      |            | T1           | T2          | T3          | T4          | T5          | T6          | T7          | T8           | T9          | T10          | T11          | T12          | T13         | T14          | T15         | T16         | T17          | T18         |      |
| Arroz                                | kg         | 0,35         | 0,39        | 0,38        | 0,39        | 0,38        | 0,34        | 0,38        | 0,39         | 0,38        | -            | -            | -            | -           | -            | -           | -           | -            | -           | -    |
| Cebada                               | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -            | -           | 0,87         | 0,85         | 0,83         | 0,85        | 0,83         | 0,85        | 0,83        | 0,85         | 0,83        |      |
| Harina de Palmiste                   | kg         | -            | 0,01        | 0,01        | -           | -           | -           | -           | -            | -           | -            | 0,01         | 0,01         | -           | -            | -           | -           | -            | -           | -    |
| Harina de Quinua                     | kg         | -            | -           | -           | 0,05        | 0,09        | -           | -           | -            | -           | -            | -            | -            | 0,05        | 0,09         | -           | -           | -            | -           | -    |
| Levadura de cerveza                  | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | 0,09        | 0,18        | -            | -           | -            | -            | -            | -           | -            | 0,09        | 0,18        | -            | -           | -    |
| Leche en Polvo                       | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,07         | 0,15        | -            | -            | -            | -           | -            | -           | -           | 0,07         | 0,15        | -    |
| Fundas                               | Unidad     | 0,00         | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00         | 0,00         | 0,00         | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00        | 0,00         | 0,00        | 0,00 |
| Mano de Obra                         | Jornal     | 0,05         | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05         | 0,05        | 0,05         | 0,05         | 0,05         | 0,05        | 0,05         | 0,05        | 0,05        | 0,05         | 0,05        | 0,05 |
| Servicios Básicos                    | USD        | 0,01         | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01         | 0,01        | 0,01         | 0,01         | 0,01         | 0,01        | 0,01         | 0,01        | 0,01        | 0,01         | 0,01        | 0,01 |
| <b>Total (400 g de Bioformulado)</b> | <b>USD</b> | <b>0,41</b>  | <b>0,46</b> | <b>0,45</b> | <b>0,50</b> | <b>0,54</b> | <b>0,48</b> | <b>0,62</b> | <b>0,52</b>  | <b>0,59</b> | <b>0,93</b>  | <b>0,92</b>  | <b>0,90</b>  | <b>0,96</b> | <b>0,98</b>  | <b>1,00</b> | <b>1,06</b> | <b>0,98</b>  | <b>1,03</b> |      |
| Costo producción (800 g)             | USD        | 0,83         | 0,91        | 0,91        | 1,00        | 1,07        | 0,97        | 1,23        | 1,05         | 1,18        | 1,86         | 1,83         | 1,80         | 1,91        | 1,97         | 2,00        | 2,13        | 1,97         | 2,07        |      |
| Costo Venta (800 g)                  | USD        | 0,94         | 2,14        | 2,21        | 2,31        | 1,76        | 3,00        | 2,16        | 0,72         | 1,59        | 1,65         | 1,37         | 1,22         | 2,63        | 1,12         | 2,12        | 2,91        | 1,55         | 2,38        |      |
| Ingreso neto (800 g)                 | USD        | 0,11         | 1,23        | 1,31        | 1,31        | 0,68        | 2,03        | 0,93        | <b>-0,33</b> | 0,42        | <b>-0,21</b> | <b>-0,46</b> | <b>-0,58</b> | 0,72        | <b>-0,85</b> | 0,12        | 0,78        | <b>-0,41</b> | 0,31        |      |
| Beneficio/Costo                      | USD        | 0,13         | 1,34        | 1,44        | 1,31        | 0,64        | 2,10        | 0,75        | <b>-0,31</b> | 0,35        | <b>-0,11</b> | <b>-0,25</b> | <b>-0,32</b> | 0,38        | <b>-0,43</b> | 0,06        | 0,37        | <b>-0,21</b> | 0,15        |      |

Nota. Considerando que 800 g de Bioformulado con una concentración de  $3 \times 10^9$  tiene un costo de 3 USD, a medida que la concentración disminuye el

costo a la venta también. Los costos de inversión no incluyen costos de amortización de equipos, solo se incluyeron los materiales usados para el desarrollo de la Investigación.

**Tabla 18***Análisis Costo-Beneficio de las formulaciones a base de Isaria spp.*

| Rubro                                | Unidad     | Tratamientos |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------------------------------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                                      |            | T19          | T20         | T21         | T22         | T23         | T24         | T25         | T26         | T27         | T28         | T29         | T30         | T31         | T32         | T33         | T34         | T35         | T36         |
| Arroz                                | kg         | 0,35         | 0,39        | 0,38        | 0,39        | 0,38        | 0,34        | 0,38        | 0,39        | 0,38        | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| Cebada                               | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,87        | 0,85        | 0,83        | 0,85        | 0,83        | 0,85        | 0,83        | 0,85        | 0,83        |
| Harina de Palmiste                   | kg         | -            | 0,01        | 0,01        | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,01        | 0,01        | -           | -           | -           | -           | -           | -           |
| Harina de Quinoa                     | kg         | -            | -           | -           | 0,05        | 0,09        | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,05        | 0,09        | -           | -           | -           | -           |
| Levadura de cerveza                  | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | 0,09        | 0,18        | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,09        | 0,18        | -           | -           |
| Leche en Polvo                       | kg         | -            | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,07        | 0,15        | -           | -           | -           | -           | -           | -           | -           | 0,07        | 0,15        |
| Fundas                               | Unidad     | 0,00         | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        | 0,00        |
| Mano de Obra                         | Jornal     | 0,05         | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        | 0,05        |
| Servicios Básicos                    | USD        | 0,01         | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        | 0,01        |
| <b>Total (400 g de Bioformulado)</b> | <b>USD</b> | <b>0,41</b>  | <b>0,46</b> | <b>0,45</b> | <b>0,50</b> | <b>0,54</b> | <b>0,48</b> | <b>0,62</b> | <b>0,52</b> | <b>0,59</b> | <b>0,93</b> | <b>0,92</b> | <b>0,90</b> | <b>0,96</b> | <b>0,98</b> | <b>1,00</b> | <b>1,06</b> | <b>0,98</b> | <b>1,03</b> |
| Costo producción (800 g)             | USD        | 0,83         | 0,91        | 0,91        | 1,00        | 1,07        | 0,97        | 1,23        | 1,05        | 1,18        | 1,86        | 1,83        | 1,80        | 1,91        | 1,97        | 2,00        | 2,13        | 1,97        | 2,07        |
| Costo Venta (800 g)                  | USD        | 0,07         | 0,06        | 0,06        | 0,21        | 0,05        | 0,06        | 0,65        | 0,05        | 0,06        | 0,06        | 0,76        | 0,49        | 0,82        | 0,61        | 0,66        | 1,35        | 0,61        | 0,68        |
| Ingreso neto (800 g)                 | USD        | -0,76        | -0,85       | -0,84       | -0,78       | -1,03       | -0,91       | -0,59       | -1,00       | -1,12       | -1,80       | -1,07       | -1,31       | -1,09       | -1,35       | -1,34       | -0,78       | -1,36       | -1,39       |
| Beneficio/Costo                      | USD        | -0,92        | -0,93       | -0,93       | -0,79       | -0,96       | -0,94       | -0,47       | -0,95       | -0,95       | -0,97       | -0,58       | -0,73       | -0,57       | -0,69       | -0,67       | -0,37       | -0,69       | -0,67       |



## Capítulo V

### Conclusiones

El control de calidad de producción de conidios de las diferentes formulaciones se basó en análisis del porcentaje de germinación, concentración de conidios/g, concentración de UFC/g y porcentaje de pureza. *Beauveria* spp. produjo una elevada esporulación de conidios con el T6 a razón de  $6,9 \times 10^9$  conidios/g en la formulación (Arroz 97,5% + Levadura de cerveza 2,5%) y una menor concentración de conidios con el T8 a razón de  $7,2 \times 10^8$  conidios/g en la formulación (Arroz 97,5% + Leche en polvo 2,5%), el tipo de formulación infirió directamente sobre los parámetros antes mencionados. Por su parte las formulaciones con *Isaria* spp. permitieron una menor esporulación, sin embargo, la mejor concentración se obtuvo con el T34 a razón de  $1,3 \times 10^9$  conidios/g en la formulación (Cebada 95% + Levadura de cerveza 5%) y una menor concentración de conidios en el T23 a razón de  $4,6 \times 10^7$  conidios/g en la formulación (Arroz 95% + Harina de quinua 5%).

En cuanto al porcentaje de germinación de conidios a las 16 horas, el mejor tratamiento fue el T25 (5% Levadura de cerveza, 95% arroz + *Isaria* spp.) con un 82,5% de germinación. La mayor concentración de unidades formadoras de colonia (UFC) fue de  $2,64 \times 10^{10}$  UFC/g para el T6. En cuanto al porcentaje de pureza no existió diferencias significativas para los 36 tratamientos.

De acuerdo al Análisis Costo-Beneficio se logró reducir costos de producción y/o mejorar los rendimientos en la producción de conidios para el T6 con un margen de utilidad de \$ 2,03, seguido del T2 con una utilidad de \$ 1,23. Los tratamientos con *Isaria* spp. no representaron utilidad, por tanto, se descarta la cepa para producción masiva.

En condiciones de laboratorio las formulaciones con cepas de *Beauveria* spp, no resultaron patogénicas para larvas de *R. microplus*, al no contar con reactivación, proceso importante para la susceptibilidad de los insectos. Se alcanzó la mortalidad mal alta con el T6 con el 8,33% a una concentración conidios  $6,9 \times 10^6$  mL.L<sup>-1</sup> al día 9 postratamiento.

## Capítulo VI

### Recomendaciones

Evaluar la efectividad de las formulaciones de *Beauveria* spp. e *Isaria* spp. *in situ*, con el fin de corroborar la patogenicidad y virulencia de los bio-insumos.

Determinar cuáles de las formulaciones proporciona una vida de anaquel prolongada al bioinsecticida.

Se sugiere la reactivación de la cepa *Beauveria* spp. sobre la especie *R. microplus*, para recuperar la especificidad del hongo.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- AgroBesser. (2022). *YURAK G (Sustrato granulado B. bassiana)*. Obtenido de <https://agrobesser.com/bioinsecticidas/beauveria-800gr-sustrato-granulado-beauveria-bassiana-pba-757.html>
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario, R., Jongejan, F., & De la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*, 106(2), 471-479. doi:doi: 10.1007/s00436-009-1689-1
- Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., . . . Viera, W. (2019). *Manual de Análisis de calidad para formulaciones con base en Hongos Biocontroladores*. Quito: INIAP.
- Berlanga, A., & Hernández. (2006). *Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos*. México: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.
- Berlanga, P., & Herrera, V. (2006). *Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos*. Colima. México: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico .
- Biegelmeyer, P., Nizoli, L., da Silva, S., dos Santos, T., Dionello, N., & Gulias-Gomes, C. (2015). Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol*, 208, 231-237. doi:doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.010
- Bustillos, R., & Rodríguez, R. (2014). *Ecología parasitaria de Rhipicephalus microplus en bovinos*. Academia Española.
- Carbadillo, E. (2022). Composición de la cebada. *Botanical*, 3.
- Carrillo, L. (2009). Cistatinas de cebada: proteínas de defensa contra artrópodos. *Tesis (Doctoral)*. Agrónomos (UPM) [antigua denominación]. Obtenido de <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.3003>

- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). Protocolos para formulación y aplicación de bio-insumo: *Beauveria Bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (Ysaú). Asunción, Paraguay: IICA.
- Fargues, J., & Remaudiere, G. (1977). Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathology*, 62(1), 31-37.
- Fedna. (05 de 05 de 2011). *Fedna*. Obtenido de Fedna:  
[http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/levadura-de-cerveza-actualizado-nov-2011](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/levadura-de-cerveza-actualizado-nov-2011)
- Fernandez, T. (2020). *Evaluación de la aplicación de Beauveria Bassiana y Metarhizium anisopliae para el control de Trips en rosas*. Quito.
- Figueroa, L., Varela, A., & Corredor, D. (2007). Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Revista de Investigación*, 7, 127-131.
- Gómez Ramírez, H., Zapata Granja, A., Torres Del Aguila, E., & Tenorio Cantoral, M. (05 de 05 de 2014). SENASA. Obtenido de SENASA:  
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. SENASA.
- Góngaras, C., Marín, P., & Benavides, P. (2009, Junio 22). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca de café. *Avances Técnicos: Cenicafe*, 384, 1-8. Retrieved from cenicafé:  
<https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/346/1/avt0384.pdf>
- Grabowski, C., Orrego, A., & Stauffer, A. (2005). *Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos: Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y Paecilomyces sp.* Investigación Agraria.

- Hernández, E., & Villanova, B. (2010). Cereales y productos derivados. *Dialnet*, 18.
- Irving, M. (2012). *Investigation on the shelf-life (storage time) and variability of Beauveria bassiana conidia: under various temperatures using sabouraud and potato dextrose medium*. University of the West Indies. doi:<https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Williams-2012-Thesis-Beauveria-bassiana.pdf>
- Kruger, R. (2008). Control microbiano de la chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. 1860 (Hemiptera:Pentatomidae) con hongos entomopatógenos. *Tesis magistral, Producción Vegetal con Orientación en Protección de Cultivos, Universidad de Buenos Aires*. Buenos Aires. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/33999284.pdf>
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19, 23-42. doi:<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-020-09525-1>
- Loza, J. (2014). Producción y aplicación en campo conidios de hongo *Metarhizium anisopliae*. México: .
- Madrigal, C. (2007). Producción de *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Scielo*, 33.
- Mantzoukas, S., Kitsiou, F., Natsiopoulos, D., & Eliopoulos, P. (2022). Entomopathogenic Fungi: Interactions and Applications. *Encyclopedia*, 2(2), 646-656. doi:<https://doi.org/10.3390/encyclopedia2020044>
- Mata, M. (2008). Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas. *Informe de trabajo final de graduación: Tecnológico de Costa Rica*. Costa Rica.
- Mejía, C. (2018). Potenciación de conidios de *Beauveria bassiana* como principio activo de un bioplaguicida para el control de larvas de *Diatrea* spp., Colombia. Obtenido de

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/69298/1010176025.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Merino. (2017). Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga. *Tesis Doctoral, Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 6, 7, 8, 10, 20, 30. Perú.

doi:<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/6483>

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, 63(95-103).

Mustata, U., & Gurvinder, K. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *ResearchGate*.

Narcizo, J. (2012). *Patogenicidad de Isaria fumosorosea Wyze (Ascomycota: Hypocreales) contra Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

doi:<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4352/T19395%20EK%20MAAS%2C%20JULIO%20NARCIZO%20%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Noboa, G., & Quelal, A. (2015). Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* como aporte a los productores de café orgánico de la Asociación "Rio Intag", Cantón Cotacachi. (*Tesis de Pregrado, Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales, Universidad Politécnica Salesiana*). Quito. Retrieved from

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>

Pacheco, E. (1996). Evaluación química y nutricional de la harina de palmiste. *CID*, 1.

- Padilla, Y. (2017). Evaluación de un bioinsecticida microencapsulado a base de Hongos Entomopatógenos aislados en Sinaloa para el control de *Heliothis virescens* (Fabricius). *Tesis magistral, Recurso Naturales y Medio Ambiente, Instituto Politécnico Nacional*. México. Retrieved from <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/90/1/Tesis%20Completa1.pdf>
- Polit, M. L. (2013). *Desarrollo de una colada fortificada con vitamina A, zinc y hierro para el desayuno escolar de niños entre 3 a 4 años 11 meses*. Quito: Quito: USFQ, 2013.
- Pucheta, M. (2006). Evaluación del efecto insecticida de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Paecilomyces fumosoroseus*, sobre mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) en frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Tesis Magistral, Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana*. México. Obtenido de <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/2049>
- Qayyum, A., Bilal, H., Naeem, U., Ali, H., & Raza, H. (2021). Factors Affecting the Epizootics of Entomopathogenic Fungi - A review. *J. Biores. Manag.*, 8(4), 78-85. doi:<https://doi.org/10.35691/JBM.1202.0204>
- Roberts, D., & Yendol, W. (1971). Use of fungi for microbial control of insects. . *Microbial Control of Insects and Mites.*, 125-149.
- Robles, I., Chacón, J., Torres, R., Landeros, J., Vanoye, V., & Arredondo, R. (2019). Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents of *Phyllocoptruta oleivora* (Prostigmata: Eriophyidae) under Greenhouse Conditions. *Florida Entomologist*, 102(2), 303-308. doi:<https://doi.org/10.1653/024.102.0203>
- Rodríguez, L., Gandarilla, F., Maldonado, M., Quintero, I., Morales, L., Alfora, J., & Santos, M. (18 de Octubre de 2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) en cultivo

- bifásico. *Interciencia*, 42(11), 739-743. Obtenido de Interciencia:  
<https://www.redalyc.org/journal/339/33953499006/html/>
- Rodríguez, R., Pérez, X., Garcés, S., Vanwambeke, S., Madder, M., & Benítez, W. (2017). The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *Plos one*, 12(4).  
doi:<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4271/1/iniapscCD113.pdf>
- Rodriguez, R., Rosado, J., Ojeda, M., Pérez, L., Martinez, I., & Bolio, M. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 298-308. Retrieved from Scielo:  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-90282014000300009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282014000300009)
- Romo, S., Rosero, A., Forero, C., & Cerón, E. (2006). POTENCIAL NUTRICIONAL DE HARINAS DE QUINUA (*CHENOPODIUM*). *Revista\_biotecnología II*, 2.
- SENASA. (2017). *Precios de productos y servicios de la SCB-2017*.
- Shapiro, D., Fuxa, J., Lacey, L., Onstad, D., & Kaya, H. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.*, 88(1), 1-7. doi:doi:10.1016/j.jip.2004.10.003.
- Sinagap. (2022). *Precios de cebada en Grano*. Riobamba. Obtenido de  
[http://sinagap.mag.gob.ec/sina/PaginasCGSIN/Rep\\_Pre\\_Prod\\_X\\_MercCGSIN.aspx](http://sinagap.mag.gob.ec/sina/PaginasCGSIN/Rep_Pre_Prod_X_MercCGSIN.aspx)
- Tabor, A., Ali, A., Rehman, G., Rocha, G., Fonseca, A., Malardo, T., & Jonsson, N. (2017). Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*  
doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00506>
- Tofiño, A., Ortega, M., Pedraza, B., Perdomo, S., & Moya, D. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Rev. argent. microbiol.*  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.005>



- Uribe, P. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos . *Rev. Cenicafé*.
- Valdés, B., & Vélez, P. (1998). Caracterización bioquímica cualitativa de aislamientos de *Beauveria bassiana* de la colección de hongos entomopatógenos de Cenicafé. *Revista Colombiana de Entomología*, 24(61-66), 1-2.
- Vélez, P., Posada, F., Marín, P., Bustillo, A., Gonzáles, M., & Osorio, E. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná. *Revista Cenicafé (Boletín Téc. N° 17)*.
- Volcy, C., & Pardo, V. (1994). Principios de micología. *Centro de publicaciones: Universidad Nacional de Colombia*, 141.
- Zambrano, C., Duarte, F., & Reyes, L. (2015). Evaluación del efecto de *Beauveria bassiana* en el control biológico de *Varroa destructor*, parásito de la abeja melífera (*Apis mellifera*) en la finca Felisa en el municipio de los patios, Norte de Santander. *Innovaciencia*, 21.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. .: *Biocontrol Science and Technology*.  
doi:10.1080/09583150701309006