

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE CEPAS DEL HONGO *Beauveria bassiana*, EN DIFERENTES
SISTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA EN EL LABORATORIO DE
FITOPATOLOGÍA**

SONIA VERONICA VILLCA ZAMORA

LA PAZ – BOLIVIA

2024

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**EVALUACIÓN DE CEPAS DEL HONGO *Beauveria bassiana*, EN
DIFERENTES SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA EN EL
LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA**

*Tesis de grado presentado como
requisito parcial para obtener el
Título de Ingeniero Agrónomo:*

SONIA VERONICA VILLCA ZAMORA

Asesor:

Ing. M Sc. Freddy Antonio Cadena Miranda

Revisores designados:

Ing. Ph. D. David Cruz Choque

Ing. M Sc. Estanislao Poma Loza

Ing. Rafael Adolfo Murillo García

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

-2024-

U.M.S.A.

DEDICATORIA

A Dios por estar presente en mi camino.

Mis queridos padres Cecilio y Cornelia por el apoyo incondicional, amor y confianza que me brindan,

A mis hermanas (c) y sobrinos por el apoyo a lo largo de la carrera universitaria.

A mi esposo que me acompaño, apoyo en esta etapa final y a la luz de mi vida mis hijos Mateo, Isaac y Naomi.

AGRADECIMIENTO

Mediante este trabajo deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

Primeramente, agradeciendo a Dios por ser mi guía, acompañándome en el transcurso de mi vida bendiciéndome con paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A: mis padres quienes siempre se esforzaron por mi educación y formarme profesionalmente para que alcance mis metas trazadas.

A: la Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, por darme la oportunidad de adquirir conocimiento y sabiduría.

A: los docentes por impartir y contribuir conocimiento en la formación académica.

A: mi asesor Ing. M Sc. Freddy Antonio Cadena Miranda, por su valioso tiempo dedicado, y por ser guía, orientador para lograr su ejecución del trabajo.

A: mi tribunal revisor, Ing. Ph. D. David Cruz Choque, Ing. M Sc. Estanislao Poma Loza y al Ing. Rafael Adolfo Murillo García; por el tiempo dedicado a la revisión por las observaciones y colaboración para el enriquecimiento del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1. Antecedentes.....	- 1 -
1.2. Planteamiento del problema.....	- 1 -
1.3. Justificación.....	- 2 -
2. OBJETIVOS.....	- 2 -
2.1. Objetivo general.....	- 2 -
2.2. Objetivos específicos.....	- 2 -
2.3. Hipótesis.....	- 3 -
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	- 3 -
3.1. Uso de la <i>Beauveria</i> en la agricultura.....	- 3 -
3.2. Hongos entomopatógenos.....	- 4 -
3.2.1. Características de los Hongos Entomopatógenos.....	- 5 -
3.2.2. Modo de acción.....	- 5 -
3.3. <i>Beauveria bassiana</i>	- 6 -
3.3.1. Taxonomía.....	- 6 -
3.3.2. Características de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 7 -
3.3.3. Ciclo biológico.....	- 10 -
3.3.4. Germinación de la espóra.....	- 11 -
3.3.5. Viabilidad de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 12 -
3.4. Producción de <i>Beauveria bassiana</i>	- 12 -
3.4.1. Reactivación de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 13 -
3.5. Costos de producción de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 14 -
4. LOCALIZACIÓN.....	- 15 -
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 16 -

5.1. Materiales.....	- 16 -
5.1.1. Material biológico:	- 16 -
5.1.2. Material de laboratorio:	- 16 -
5.1.3. Cristalería.....	- 17 -
5.1.4. Reactivos.....	- 17 -
5.1.5. Varios	- 17 -
5.1.6. Material de escritorio	- 18 -
5.2. Metodología.....	- 18 -
5.2.1. Preparación y reconocimiento de los ambientes.....	- 18 -
5.2.2. Reactivación del hongo.....	- 18 -
5.2.3. Preparación de las bolsas	- 20 -
5.2.4. Inoculación de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	- 22 -
5.2.5. Secado y cosecha del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	- 22 -
5.2.6. Evaluación del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	- 23 -
5.3. Variables de respuesta.....	- 26 -
5.4. Diseño experimental	- 27 -
5.4.1. Modelo lineal	- 27 -
5.4.2. Factores de estudio.....	- 28 -
5.4.3. Tratamientos	- 28 -
5.4.4. Croquis del experimento.....	- 28 -
5.4.5. Análisis estadístico	- 29 -
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	- 29 -
6.1. Resultados.....	- 29 -
6.1.1. Características de comportamiento de inoculación en el medio de cultivo.....	- 29 -
6.1.2. Características de comportamiento de inoculación en los sustratos	- 30 -
6.1.2.1. Porcentaje de desarrollo de las cepas a los 12 días	- 32 -
6.1.2.1.1. Análisis de varianza a los 12 días de desarrollo.....	- 33 -
6.1.2.2. Porcentaje de desarrollo de las cepas a los 21 días	- 35 -
6.1.2.2.1. Análisis de varianza a los 21 días de desarrollo.....	- 35 -
6.1.2.3. PESO DE LAS CONIDIAS	- 37 -
6.1.2.3.1. Análisis de varianza del peso de conidias en gramos	- 38 -
6.1.2.4. NÚMERO DE CONIDIAS	- 39 -
6.1.2.4.1. Análisis de varianza del número de conidias/ml	- 41 -

6.1.2.5. Viabilidad de las conidias.....	- 42 -
6.1.2.6. Costos de producción	- 42 -
7. CONCLUSIONES.....	- 44 -
8. RECOMENDACIONES.	- 45 -
BIBLIOGRAFIA	- 47 -
ANEXOS.....	- 53 -

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de estudio.....	- 28 -
Cuadro 2. Croquis del experimento.....	- 28 -
Cuadro 3. Análisis de varianza a los 12 días de desarrollo.....	- 34 -
Cuadro 4. Prueba Duncan con error de 1,40.....	- 34 -
Cuadro 5. Análisis de varianza a los 21 días de desarrollo.....	- 36 -
Cuadro 6. Pruebas Duncan con error de 0,85.....	- 36 -
Cuadro 7. Análisis de varianza del peso de conidias en gramos.....	- 38 -
Cuadro 8. Prueba Duncan con un error de 0,10.....	- 39 -
Cuadro 9. Análisis de varianza del número de conidias sobre mililitro.	- 41 -
Cuadro 10. Prueba Duncan con el error de 1,8E+6	- 41 -
Cuadro 11. Costo de los diferentes sustratos.	- 43 -
Cuadro 12. Cuadro del beneficio costo de los sustratos.....	- 44 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 8 -
Figura 2. Ciclo reproductivo de la <i>Beauveria bassiana</i>	- 10 -
Figura 3. Germinación de esporas: A) Esporas levemente ovaladas. B) Hifas septadas. C) Conidióforo simple. D) Proliferación del conidióforo. E) Esquema de maduración.	- 11 -
Figura 4. Localización del micelio en la cereza del café.	- 14 -
Figura 5. Ubicación geográfica del estudio.	- 15 -
Figura 6. A) Extracción de la broca. B) Brocas infestadas con <i>Beauveria bassiana</i> . C) Broca con <i>Beauveria bassiana</i> en PDA. D) Cultivo puro de <i>Beauveria bassiana</i>	- 20 -
Figura 7. A) Selección de impurezas. B) Embolsado. C) El pesaje y autoclavado de las bolsas.	- 21 -
Figura 8. A) Cámara flujo laminar. B) El aza de platino previamente flameada para la inoculación. C) Esporulación de la <i>Beauveria bassiana</i> en el sustrato del trigo.	- 22 -
Figura 9. A) Bolsa de sustrato lista para la cosecha. B) Cosecha del sustrato del arroz y trigo.	- 23 -
Figura 10. Preparación de las disoluciones.	- 24 -
Figura 11. Descripción de la cámara de Neubauer.	- 24 -
Figura 12. Conteo de conidias.	- 25 -
Figura 13. Conidias germinadas.	- 25 -
Figura 14. <i>B. bassiana</i> en medio de cultivo PDA: A) C- Local, B) C- 24, C) C- 13	- 30 -
Figura 15. Desarrollo del hongo: A) sustrato de arroz, B) sustrato de avena y C) sustrato de trigo.	- 31 -
Figura 16. Medias de desarrollo del hongo entomopatógeno.	- 33 -
Figura 17. Porcentaje de desarrollo a los 21 días.	- 35 -
Figura 18. Peso de las conidias.	- 38 -
Figura 19. Número de conidias sobre mililitro.	- 40 -

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Desinfección con rayos de luz ultra violeta en la cámara flujo laminar.

Anexo 2. Inoculación del hongo entomopatógeno en la cámara flujo laminar.

Anexo 3. Reactivación del hongo entomopatógeno, en brocas de café.

Anexo 4. Desarrollo de Beauveria bassiana en medio de cultivo PDA.

Anexo 5. Desarrollo de Beauveria bassiana en los diferentes sustratos: arroz, trigo y avena.

Anexo 6. Sustratos en el autoclave, y enfriamiento en la cámara flujo laminar.

Anexo 7. Disoluciones de las cepas de Beauveria bassiana.

Anexo 8. Cámara de Neubauer con las disoluciones para realizar el conteo de conidios.

Anexo 9. Porcentaje de desarrollo de la Beauveria bassiana a los 12 días.

Anexo 10. Porcentaje de desarrollo de la Beauveria bassiana a los 21 días.

Anexo 11. Peso final del sustrato con Beauveria bassiana.

Anexo 12. Peso de la cepa de Beauveria bassiana.

Anexo 13. Número de conidias en la disolución N°6.

Anexo 14. Costo de producción del sustrato del arroz.

Anexo 15. Costo de producción del sustrato del trigo.

Anexo 16. Costo de producción del sustrato de la avena.

RESUMEN

La reproducción del hongo entomopatógeno de *Beauveria bassiana*, es una alternativa favorable para el medio ambiente y los seres vivos

El uso de este hongo entomopatógeno es usado como control biológico eficiente debido a su alto grado de patogenicidad; donde muchos lugares están optando por este método de control para la agricultura.

La *Beauveria bassiana* se desarrolla entre 20° a 28° C; se encuentra en el ambiente, agua, suelos y también pueden estar alojados en insectos; contando con las condiciones favorables su multiplicación y dispersión es de manera favorable llegando a causar la muerte del insecto.

Para la reproducción masiva de la *Beauveria bassiana* se utilizó tres tipos de sustrato: arroz, trigo y avena. Anticipadamente se realizó la reactivación de las cepas para mayor eficacia.

Se observaron el desarrollo de 12 días y 21 días, donde su crecimiento fue de manera normal con las características definidas de cada cepa. Tanto en los sustratos de trigo y avena se tomaron datos a los 15 días.

El sustrato de mejor rendimiento a las distintas observaciones es del arroz junto a la C-24, mostrando su óptimo desarrollo y encontrándose dentro de los parámetros establecidos de distintos autores.

En tanto los sustratos de trigo y avena no rindieron bien, debido a la oxidación.

Las cepas de mejor desarrollo es la C-24 seguido de la C- local finalmente la C-13; pero en los sustratos de trigo y avena los que se desarrollaron es la C-24, C-13 y C-local.

En cuanto al beneficio muestra una buena rentabilidad en el sustrato del arroz, afectando este con los demás sustratos.

Palabras claves:

Inoculación, *Beauveria bassiana*, reactivación, entomopatógeno, sustrato, viabilidad.

SUMMARY

The reproduction of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is a favorable alternative for the environment and living beings.

The use of this entomopathogenic fungus is used as an efficient biological control due to its high degree of pathogenicity; where many places are opting for this control method for agriculture.

Beauveria bassiana develops between 20° to 28° C; It is found in the environment, water, soil and can also be housed in insects; With favorable conditions, its multiplication and dispersion is favorable, causing the death of the insect.

For the mass reproduction of *Beauveria bassiana*, three types of substrate were used: rice, wheat and oats. The reactivation of the strains was carried out in advance for greater efficiency.

The development of 12 days and 21 days was observed, where its growth was normal with the defined characteristics of each strain. Data were taken after 15 days in both wheat and oat substrates.

The substrate with the best performance according to the different observations is rice together with C-24, showing its optimal development and being within the parameters established by different authors.

Meanwhile, wheat and oat substrates did not perform well, due to oxidation.

The strains with the best development are C-24 followed by the local C-, finally C-13; but in wheat and oat substrates, C-24, C-13 and local C- were developed.

As for the benefit, it shows good profitability in the rice substrate, affecting this with the other substrates.

Keywords:

Inoculation, *Beauveria bassiana*, reactivation, entomopathogen, substrate, viability.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Desde hace tiempo se viene estudiando los hongos entomopatógenos, ya que los hongos pueden parasitar y alimentarse del insecto.

Villalba, *et al.*, (2009). Cito que la utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura como un método de control biológico ha ido en aumento en los últimos años, debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas (Téllez, *et al.*, 2009).

Para desarrollar programas de control de insectos plagas mediante hongos entomopatógenos es necesario obtener formulaciones que conserven sus características biológicas al ser utilizadas en el campo (Alves y Pereira 1998), citado por (Bustillo y Marín 2015).

La producción de hongos entomopatógenos para el control de insectos plagas, se viene desarrollando en países como China, Cuba, Brasil, Perú, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Venezuela y otros (Hussey y Tinsley, 1981; Batista, *et al.*, 1988; Antía, *et al.*, 1992). (Villalba, *et al.*, 2009).

En México el empleo de bioinsecticidas es a base de *Beauveria bassiana*, existiendo varias técnicas de formulación. Según (García, *et al.*, 2008).

Agüero, *et al.*, (2009). Cito que la *Beauveria bassiana* se da a conocer cuando en 1834 Agostino Bassi demostró que el hongo era agente causal de una enfermedad en el gusano de seda *Bombix mori*. En América central su uso más importante ha sido para el control de la broca de café.

1.2. Planteamiento del problema

¿Cuál tipo de sustrato entre el arroz, trigo y avena influye para la reproducción masiva de cepas de conidias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, en el laboratorio, para beneficio de la agricultura?

1.3. Justificación

Se ha observado que el uso de plaguicidas es muy habitual en los productores, donde muchos hacen un mal uso de los químicos; como resultado existe la contaminación del ambiente, suelo y salud.

Convirtiéndose en agentes tóxicos a largo plazo, que conlleva a mayores riesgos para la salud.

Además, aplicados sobre los cultivos estos agentes tóxicos permanecen en mínima cantidad en los productos de consumo, llegando a dañar nuestra salud.

En la contaminación del suelo, causa erosión; al usar los plaguicidas en el ambiente este se va propagando a los alrededores, causando contaminación en los ríos y aguas subterráneas.

Entonces la reproducción masiva de *Beauveria bassiana*, que es un hongo entomopatógeno principalmente de la broca del café; se usara como un controlador biológico sin causar contaminación al ambiente y la salud.

Este manejo biológico será de gran beneficio para el sector productivo, como también para los agricultores, evitando el uso de agentes tóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar en diferentes tipos de sustratos: arroz, trigo y avena, la reproducción masiva de cepas de conidias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, en el laboratorio, para el beneficio en la agricultura.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características morfológicas de producción y rendimiento de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* en tres diferentes sustratos.
- Analizar la viabilidad y la concentración inoculada, del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, en cada sustrato.
- Determinar los costos de producción parciales para la reproducción masiva de conidias de *Beauveria bassiana*, en los diferentes sustratos.

2.3. Hipótesis

- **Ho:** Los diferentes tipos de sustratos no influyen en la reproducción masiva de *Beauveria bassiana*.
- **Ha:** Los diferentes tipos de sustratos influyen en la reproducción masiva de *Beauveria bassiana*.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1. Uso de la *Beauveria* en la agricultura

El desarrollo y aplicación de agentes de control biológico de plagas adquiere relevancia como alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible que preserve los recursos naturales y el medio ambiente, citado por (Rodríguez, *et al.*, 2017).

El hongo *Beauveria bassiana* es considerado uno de los agentes de control biológico con mejor eficiencia en el sector agrícola. Existen experiencias de todas partes del mundo en el control exitoso de varios tipos de plagas, que causan daño y grandes pérdidas en el sector. (Chiriboga, *et al.*, 2015).

Logran un buen desarrollo los hongos entomopatógenos, constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. (Monzón, 2001).

Chiriboga, *et al.*, (2015), menciona las diferentes características:

- Viven naturalmente en el ambiente, suelos o en agua, como así también alojados en los insectos, causando su muerte en un plazo aproximado de cinco a siete días; con la posibilidad de propagar la enfermedad a otros insectos bajo condiciones favorables de temperatura y humedad.
- Los entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, se multiplican y dispersan dentro del mismo cultivo favoreciendo la acción reguladora de la población de insectos-plaga.

- Éstos permanecen en el área en insectos vivos invernantes; en sus restos o en el suelo; y pueden ser transmitidos de una generación a otra del insecto, por contaminación de los desoves e infección de las crías recién nacidas.
- Los microorganismos pueden ocasionar no sólo la muerte directa de los insectos, sino también la disminución de la oviposición; viabilidad de los desoves o aumentar la sensibilidad a otros agentes de control.
- Una vez establecido el entomopatógeno en el área, mantiene la población de la plaga por debajo de los niveles de daño económico.
- Los entomopatógenos no contaminan el ambiente y no son tóxicos para el hombre y otros animales.
- La aparición de resistencia en los insectos hacia los patógenos es extremadamente baja, comparada con la alta probabilidad de adquirirla, si se usaran agroquímicos.

3.2. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos se encuentran en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc.; que se desarrollan en lugares frescos, húmedos y con poco sol. (Monzón, 2001).

Siendo que, en la naturaleza, los hongos entomopatógenos pueden eliminar plagas o mantenerlas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos (Azevedo, 1998), que mencionó (Rodríguez, *et al.*, 2017).

Los primeros microorganismos que se identificaron como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, debido a que era posible observar su crecimiento sobre el cuerpo de estos. Los hongos patógenos de insectos, conocidos como hongos entomopatógenos, penetran, invaden y se multiplican dentro de los insectos. (Góngora, *et al.*, 2009).

Giraldo (2007) como se citó en Poma (2011), los hongos entomopatógenos son organismos heterótrofos (falta de fotosíntesis), que poseen células quitinizadas, normalmente no móviles; destacando comercialmente la *B. bassiana* (Coleópteros),

V. lecanii (Áfidos, moscas blancas y tisanópteros) y *M. anisopliae* (Homópteros, en general).

Mejía, *et al.*, (2008). Afirma, El inicio de la infección se realiza por germinación de las esporas del hongo sobre el tegumento del individuo plaga. La dispersión de las esporas se realiza a través del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto con otros sanos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro hospedantes (insectos y ácaros).

Pero estos organismos dependen generalmente de las condiciones ambientales de temperatura (25° C) y de elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. (Mejía, *et al.*, 2008).

3.2.1. Características de los Hongos Entomopatógenos

Según Mejía, *et al.*, (2008). presentan las siguientes características:

- Alto poder patogénico.
- Capacidad de multiplicación y dispersión en el ambiente a través de los individuos de la misma población.
- Se desarrollan a temperaturas entre 20 y 28 °C, pero no a 37 °C, por lo que se puede deducir que no son dañinos al hombre y animales de sangre caliente.
- Inocuidad para insectos benéficos.
- Crecen rápidamente en medios de cultivo, utilizados comúnmente en trabajos microbiológicos.
- Se pueden aplicar con equipos agrícolas convencionales. (Parada y Serrano, 1998).

3.2.2. Modo de acción

Mejía, *et al.*, (2008). Afirma según (Roberts y Humber, 1984; Hajek y St Legar, 1994, citados por Vargas, s.f.), el proceso de desarrollo de una enfermedad producida por hongos se divide en 10 pasos:

- Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto

- Germinación de la conidia en la cutícula del insecto.
- Penetración de la cutícula.
- Crecimiento del hongo en el hemocele.
- Producción de toxinas.
- Muerte del insecto.
- Desarrollo de la fase micelial.
- Emergencia del micelio hacia el exterior.
- Producción de unidades infectivas.
- Dispersión de las unidades infectivas.

3.3. *Beauveria bassiana*

Entre los hongos entomopatógenos más conocidos esta *Beauveria bassiana*, considerada como la especie más ampliamente distribuida de su género 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. (Rodríguez, *et al.*, 2017).

El hongo *Beauveria bassiana* es utilizado exitosamente en muchas regiones del mundo, como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas, por sus características patogénicas para controlar insectos, por su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso (Esperanza, *et al.*, 2008), ambientalmente favorable y sin efectos tóxicos. (Baeteman, 1997). Citado por (Villalba, *et al.*, 2009).

3.3.1. Taxonomía

La *Beauveria bassiana*, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Sordariomycetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora (conidial), y de esta manera entra en la clasificación de los hongos superiores (hongos imperfectos) y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos. (Castillo, *et al.*, 2012).

Según Bio Work, (1996) citado por Cohela, (2009); *Beauveria bassiana* es un hongo imperfecto.

De acuerdo con Ramírez, (2020)., citado en (Mauricio, 2019), la *Beauveria bassiana*, pertenece al reino de los Fungí (designa a un taxón o grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y los organismos productores de setas).

Son de la división de las Ascomycota, cuyos hongos con micelio tabicado, producen ascosporas endógenas; además es de la clase Sordariomycetes; esta clase generalmente produce sus ascas en cuerpos fructíferos periteciales, es conocida como Pyrenomycetes ya que suelen aparecer en bosques que han sido arrasados por el fuego.

Pertenece a la orden de las Hypocreales que usualmente se reconocen por sus brillantes colores, periteciales ascomatas, o estructuras productoras de esporas; Género de *Beauveria* y de la especie *bassiana*, cuyas diversas especies son típicamente patógenos de insectos.

La clasificación taxonómica se resume de la siguiente manera:

Dominio: Eukaryota
División: Ascomycota
Subdivisión: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Hypocreaceae
Género: *Beauveria*
Especie: *Beauveria bassiana*

3.3.2. Características de la *Beauveria bassiana*

Las unidades de reproducción de los hongos son llamadas esporas o conidias, que usualmente son las que infectan a los insectos. (Góngora *et al.*, 2009)

(Bustillo, 2002; Samson *et al.*, 1988; Alean, 2003), citado por Poma, (2011) El hongo *B. bassiana* agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y

unicelulares, de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5 μm) se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente.

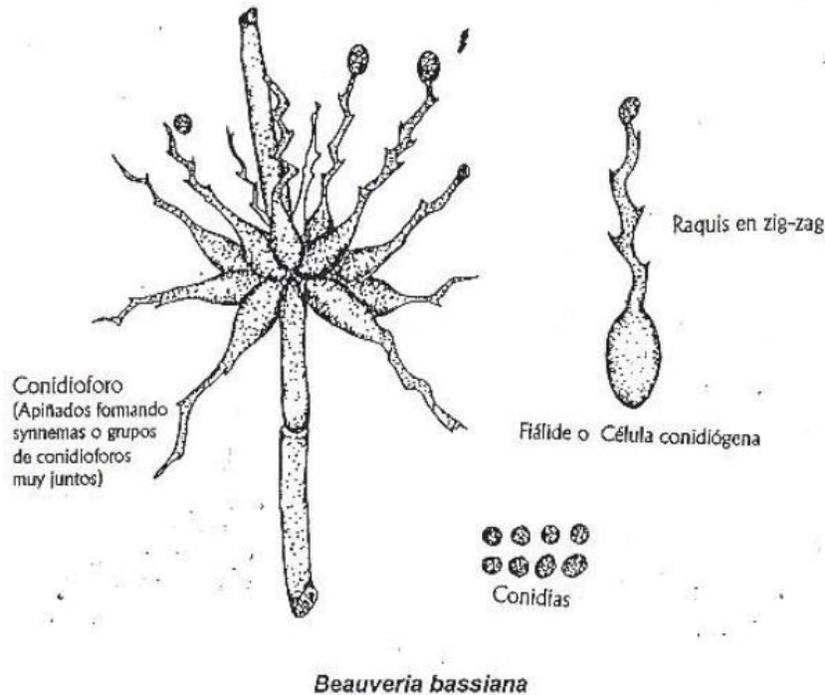


Figura 1. Características de la *Beauveria bassiana*.

Como señala Gómez, *et al.*, (2014). Son colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálido, incoloras al reverso, amarillas o rojizas, en medio Papa –Dextrosa – Agar (PDA) o Agar Papa Dextrosa y presentan aspecto pulverulento, abundante esporulación.

Como hace notar Schapovaloff, (2012). Las colonias crecen de 0,6-2,3 cm en 8 días a 20 °C, de color blanco con una apariencia pulverulenta con abundantes conidios (Domsch y Gams, 1980). La germinación de los conidios requiere de una temperatura óptima de 25-30 °C (mínimo de 10° C y máximo de 30° C), el pH óptimo para su crecimiento es de 5,7- 5,9 y para la formación de conidios de 7-9 (Domsch y Gams, 1980).

Las principales ventajas de los HE son (Kamp y Bidochka, 2002; Glare, 2004) citado por: (Escamilla, *et al.*, 2016).

- Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas.
- Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
- Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas, logrando efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
- No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.
- Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el desarrollo normal del ciclo de vida del insecto.

Las principales desventajas descritas por (Cañedo y Ames, 2004). Destacado por Alberto. (2016).

- Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta.
- Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
- En general los insecticidas biológicos no matan instantáneamente.
- Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente.

Para que la manifestación de los hongos entomopatógenos tenga lugar, los factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrimentos presentes en los insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos. (Delgado, y Murcia. 2011).

3.3.3. Ciclo biológico

Desde el punto de vista de Cabello, (2006).

- La espora germina sobre el tegumento, rara vez, es ingerida vía oral.
- Las hifas colonizan todo el hemocele del insecto.
- En condiciones favorables, se producen estructuras que salen del insecto y se produce la fructificación.

Carballo *et al.*, (2004) que cito Flores Choquehuanca, (2009) indica que el ciclo de vida de *B. bassiana* comprende dos fases, una patogénica y la otra saprofítica. La fase patogénica involucra cuatro pasos principales: Adhesión, germinación, diferenciación y penetración. La fase saprofítica ocurre dentro del hemocele con un crecimiento profílico del hongo.

Según (Delgado 2008), citado por Poma (2011), el ciclo de *B. bassiana* se divide en fase infectiva y fase reproductiva, (Figura 2). La fase infectiva se desarrolla desde la germinación de la espora sobre el integumento del insecto hasta su muerte, donde los factores para el crecimiento están relacionados con las condiciones nutricionales, temperatura y humedad que le ofrece el huésped. La fase reproductiva se manifiesta después de la muerte del insecto, y cumple dos etapas: miceliación y esporulación, donde las condiciones de humedad y la humedad son estrictas para su manifestación.

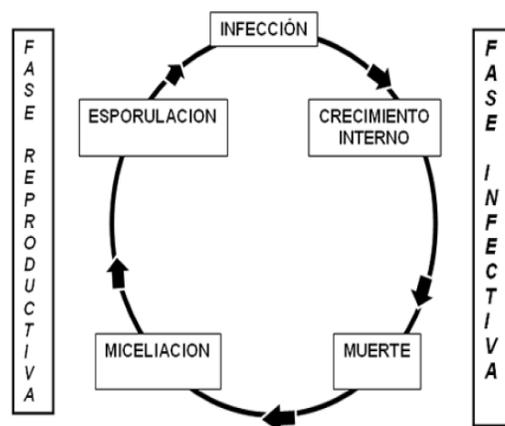


Figura 2. Ciclo reproductivo de la Beauveria bassiana.

3.3.4. Germinación de la espora

Volcy y Pardo, (1994) como se citó Foronda (2009) Se entiende por germinación el proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinales, los cuales por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas.

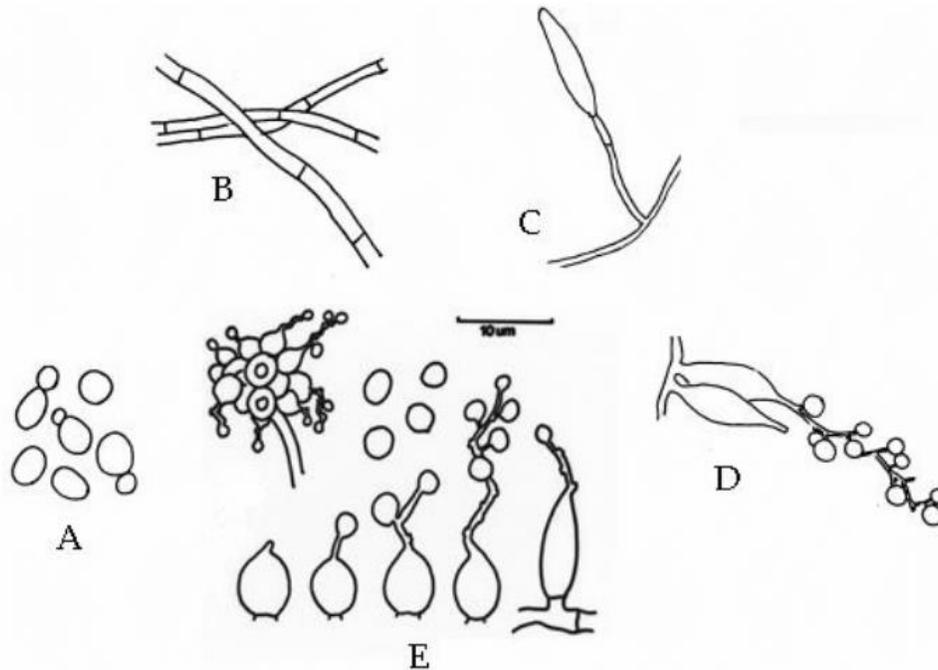


Figura 3. Germinación de esporas: A) Esporas ligeramente ovaladas. B) Hifas septadas. C) Conidióforo simple. D) Proliferación del conidióforo. E) Esquema de maduración.

Tanada y Kaya, (1993) como se citó Foronda (2009) La germinación de las esporas en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura. Y en menor grado de las condiciones nutricionales y de luz.

Guillespie, (1988) como citó Foronda (2009) El nivel de agua determina el crecimiento de los hongos y pequeñas diferencias en el nivel de humedad relativa, después de la aplicación de conidios se puede determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga.

Samson *et al.*, (1988) como se citó en Foronda (2009). El resultado de la germinación del hongo y la penetración no depende necesariamente del porcentaje

total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero.

Para la verificación de la germinación de los agentes entomopatógenos con los hongos, se evalúa el crecimiento radial, a través del diámetro de las colonias y el número de conidios producidos. (Tanzini *et al.*, 2001).

3.3.5. Viabilidad de la *Beauveria bassiana*

El objetivo de la prueba de viabilidad es el tiempo de germinación de las esporas de los hongos en estudio, ya que se requiere que la germinación de las esporas sea mayor o igual al 85% en menos de 24 horas, debido a que las aplicaciones en campo requieren condiciones ambientales diferentes a las aplicaciones en laboratorio. Destacado por Mejía *et al.*, (2008)

La germinación de las esporas en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura y en menor grado de las condiciones de luz y nutricionales (Tanada y Kaya 1993; citado por Alean, 2003). Poma. (2011).

Bahamón, *et al.*, (s. f.). Afirma: Encontrándose que, a menor temperatura de preservación, la viabilidad se mantiene estable hasta las 24 semanas de almacenamiento con un resultado de 67.3% de germinación.

Barajas, *et al.*, (2009). Afirma que: Para evaluar la viabilidad de las esporas, se vacía un mililitro de dilución de esporas en cajas petri, conteniendo como medio de cultivo agar PDA en una película delgada; se marca el espacio mojado durante 24 horas; se observaran ante el microscopio y se toma el criterio para espora germinada, toda aquella espora que mostrará de manera visible el tubo germinativo.

3.4. Producción de *Beauveria bassiana*

Según Monzón (2001), citado por Carreño (2003); la producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato. (Mejía *et al.*, 2008).

Caballero. (2014). afirma que: En general se emplean cuatro formas de producción;

- Cultivos sobre soportes sólidos en bandejas, frascos o bolsas.
- Cultivos líquidos agitados en zaranda. (fermentación sumergida)
- Cultivos líquidos en condiciones estáticas (frascos)
- Cultivos bifásicos, donde se realiza el inóculo en forma líquida agitado o estático y posteriormente se pasa al soporte sólido

Los métodos de producción desarrollados incluyen desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción industrial a gran escala que se realiza en empresas más grandes o compañías, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados, como señala Monzón. (s. f.).

Como lo hace notar Antía *et al.*, (1992). La siembra consiste en tomar un trozo del cultivo puro (raspaje del plato) y esporulado e introducirlo en las botellas, plásticos, etc. Con el medio esterilizado para que el hongo se multiplique; donde no haya corriente de aire, y no sea frecuentado por muchas personas.

Rodríguez *et al.*, (2017). Menciona para la producción masiva de hongos entomopatógenos comúnmente se usa como sustrato sólido el grano de arroz (*Oryza sativa L.*) por mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutricional y algunas condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en términos de aireación y humedad (Bhanu-Pakrasha *et al.*, 2008).

Otros sustratos comúnmente utilizados son: cebada, avena, frijol, sorgo, trigo, soya, mijo, cacahuate, garbanzo, lenteja, chícharo, caupí (frijol africano) y estiércol de vaca (Figueroa *et al.*, 2007; Saha-yaraj y Namasivayam, 2008; Bhadauria *et al.*, 2012; Gang-war 2013). Citado por Rodríguez *et al.*, (2017).

3.4.1. Reactivación de la *Beauveria bassiana*

Es conocido el procedimiento para mantener la virulencia constante mediante inoculación del hongo a un insecto hospedero vivo y su posterior re-aislamiento una vez muerto el mismo. La frecuencia de estos pases por insectos está dada por las veces que la cepa puede ser multiplicada sin perder su virulencia recomendándose

generalmente hacerla cada 3 ó 4 pases por medio de nutriente natural o sintético. Expresado por (Mejía *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de Castillo *et al.*, (2008). Se deben seguir los siguientes pasos:

- Localización de micelios de *B. bassiana* en cerezas de café (sustrato natural).
- Aislamiento, purificación de la cepa y valoración de la calidad: viabilidad, patogenicidad y concentración [nº conidias/g].
- Siembra del hongo en el medio esterilizado o sustrato.



Figura 4. Localización del micelio en la cereza del café.

3.5. Costos de producción de la *Beauveria bassiana*

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en cuanto a su producción semi industrial masiva es económicamente manejable, sus costos varían según el lugar, la consistencia y la presentación.

Poma, (2011). Menciona sobre los costos que variables de producción de un promedio de: 4.40 Bs/bolsa de 200 g, sin contar con los costos fijos; basado en el mes de abril del 2010.

En el laboratorio de fitopatología de la facultad de Agronomía, se realiza la venta del hongo entomopatógeno *B. bassiana* basándose a Bs 20, la bolsa de 200 g.

4. LOCALIZACIÓN.

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes del laboratorio de fitopatología, que se encuentra en la Facultad De Agronomía De La Universidad Mayor De San Andrés. De la ciudad de La Paz.

Su ubicación está situada aproximadamente a una altura de 3650 msnm, geográficamente situada entre los paralelos 16°30'00" latitud Sur, y 68°08'00" Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich.

-16.506164, -68.132712



Figura 5. Ubicación geográfica del estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Materiales

5.1.1. Material biológico:

Grano de café

Broca (*Hypothenemus hampei*)

Arroz; trigo y avena

Hongo:

- *Beauveria b. local*;
- *Beauveria b. C-24*;
- *Beauveria b.C-13*.

5.1.2. Material de laboratorio:

- Cámara flujo laminar
- Cámara de Neubauer
- Agitador magnético
- Autoclave
- Microscopio
- Mufla
- Micro ondas
- Mechero
- Balanza
- Pinzas
- Bisturí
- Aza de platino
- Termómetro
- Pincel

5.1.3. Cristalería

- Porta y cubre objetos
- Caja Petri
- Vaso de precipitado
- Matraz
- Pipeta

5.1.4. Reactivos

- Agua destilada
- Papa dextrosa agar (PDA)
- Hipoclorito de sodio
- Etanol

5.1.5. Varios

- Papel absorbente
- Papel madera
- Plastifim
- Bolsa de polipropileno
- Engrampadora
- Fosforo
- Cinta masquin
- Bañadores
- Toalla
- Esponja
- Detergente
- Olla
- Bandejas
- Zaranda
- Cámara fotográfica
- Guardapolvo; barbijo, gorro y guantes

5.1.6. Material de escritorio

Computadora; cuaderno; bolígrafos; papel.

5.2. Metodología

5.2.1. Preparación y reconocimiento de los ambientes

La reproducción masiva de *Beauveria* se realizó en el laboratorio de fitopatología; del mismo modo el reconocimiento de la ubicación de los materiales, equipos e instrumentos.

Como siguiente paso se realizó la limpieza general del laboratorio y la desinfección con hipoclorito de sodio. Con los materiales de cristalerías se procedió a la esterilización al autoclave.

5.2.2. Reactivación del hongo

Para la reactivación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, se debe seguir una serie de pasos, donde se detalla a continuación:

- Realizar la limpieza del lugar trabajo, con hipoclorito de sodio al 70%.
- Se recolecta granos de café, infectados con broca, de la estación experimental de Sapecho.
- Realizar la extracción de las brocas de los granos de café, con la ayuda del microscopio para mayor visibilidad.
- Una vez obtenidas las brocas se las deposita en la caja Petri, donde se encuentran preparadas en camas con papel absorbente picado; ayudando a la absorción de la humedad.
- Se realiza la limpieza de las brocas obtenidas:
Con la solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, se realiza el lavado de las brocas de café, durante 10 minutos; seguidamente se realiza el triple enjuague con agua destilada en tiempos de 5 minutos, para la absorción de la humedad poner las brocas de café en papel toalla.
- A continuación, se prepara la suspensión de los diferentes tipos de hongo entomopatógeno de *Beauveria bassiana* de un raspaje (aproximadamente de

5 mm³) con el aza de platino se depositó en un recipiente de vidrio con agua destilada de 10 ml.

- Se deposita 10 brocas de café en cada recipiente con la solución preparada; se deja reposar por 2 minutos.
- Previamente las cajas petri esterilizadas se pone una cama de papel toalla humedecida, para introducir las brocas de café ya reposadas en la suspensión del hongo entomopatógeno; terminando el procedimiento se realiza el sellado de las cajas con sus respectivos datos.
- Las muestras realizadas se dejaron por 2 semanas para su reactivación.
- Para la obtención de un cultivo puro se prepara el medio de cultivo con PDA (papa dextrosa agar) de 50 ml, este medio de cultivo se deposita en las cajas Petri esterilizadas; se introducen 3 brocas a cada caja de los diferentes hongos entomopatógenos. Para su óptimo desarrollo de reproducción se deja reposar por 21 días.
- Para la obtención de su pureza del hongo entomopatógeno se prepara nuevamente el medio de cultivo (PDA), realizando la inoculación de las cepas del hongo del anterior medio de cultivo.
- En la preparación del cultivo madre con los sustratos, se realizó la inoculación de la cepa con el cultivo puro obtenido anteriormente.
- Para esto preparamos las bolsas de polipropileno con el sustrato de 100 gramos previamente cosido. Una vez listas las bolsas se las engrampo y se las llevó al autoclave por 15 minutos a 1.5 atm.
- Cañedo, y Ames. (2004). Afirma, Pasado el tiempo se las deja enfriar y llevar a la cámara de flujo laminar, donde el uso de los rayos de luz ultravioleta (U.V.) es eficaz para eliminar organismos que se encuentran sobre superficies, ya que este tipo de luz tiene poca penetración.
- Seguidamente se realiza la desinfección de la cámara y realizamos la inoculación de la *Beauveria* nuevamente las engrampamos y las dejamos por 21 días.
- Ya obteniendo el cultivo madre se volvió a sembrar en medio de PDA. Por 15 días más para su obtención.

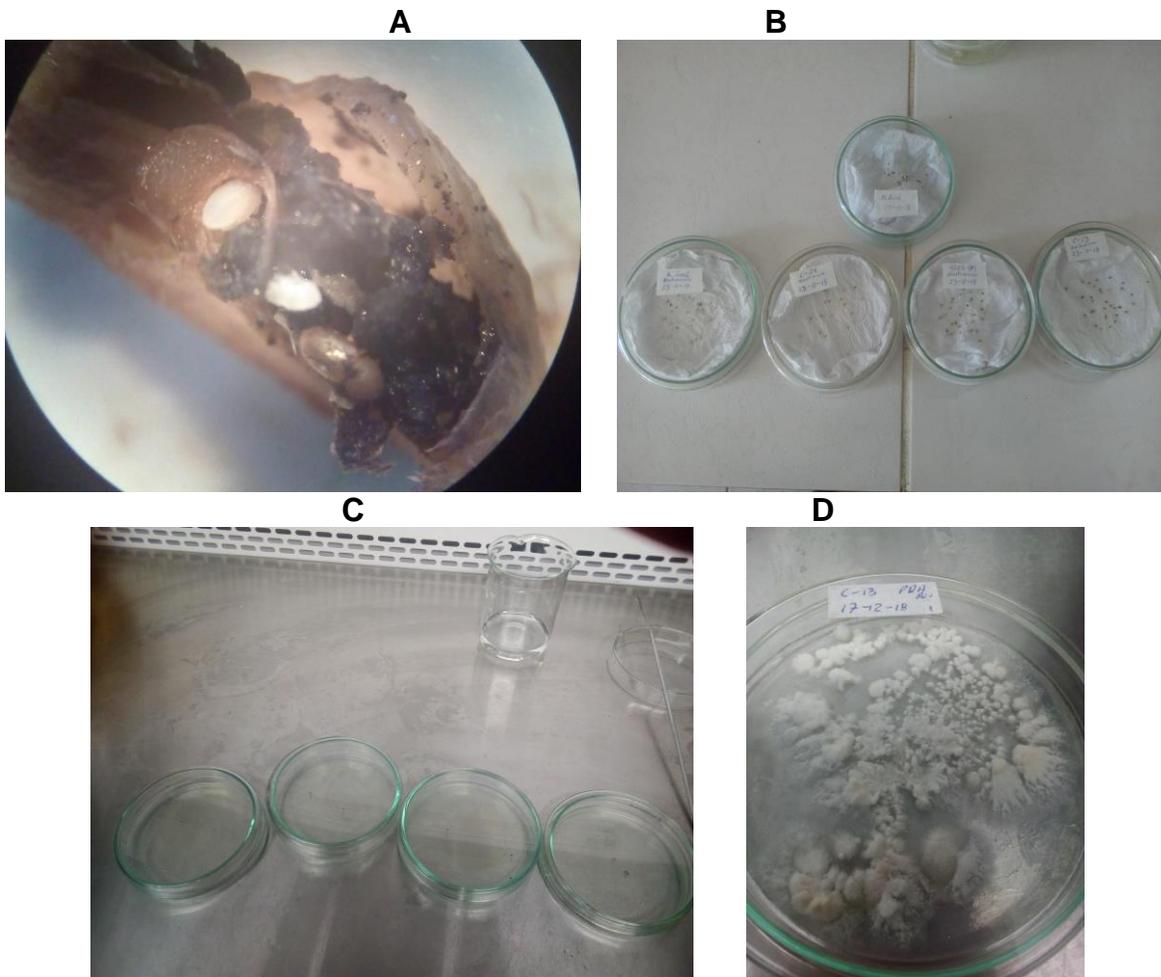


Figura 6. A) Extracción de la broca. B) Brocas infestadas con *Beauveria bassiana*. C) Broca con *Beauveria bassiana* en PDA. D) Cultivo puro de *Beauveria bassiana*.

5.2.3. Preparación de las bolsas

Para la preparación de las bolsas se debe de realizar la selección de las impurezas de los sustratos, como piedrecillas, granos en mal estado, cascaras; y el lavado para perder las impurezas.

La preparación del sustrato será diferente para cada tipo: el arroz por cada 100 g/50 ml de agua, y la cocción será por 10 min aproximadamente. El trigo se lavó con agua caliente y se quitó el exceso del agua; la avena solo se lavó con agua fría.

Listo ya las bolsas de polipropileno por bolsa se pesó 100 gramos de sustrato, de cada sustrato se obtuvo 9 bolsas. Seguidamente se las sello con la engrampadora.

Las bolsas fueron llevadas al autoclave, son esterilizadores a presión de vapor de agua. Murillo. (2014). Por 15 minutos a 1.5 atm. Pasado el tiempo se las dejo enfriar para llevar a la cámara flujo laminar.

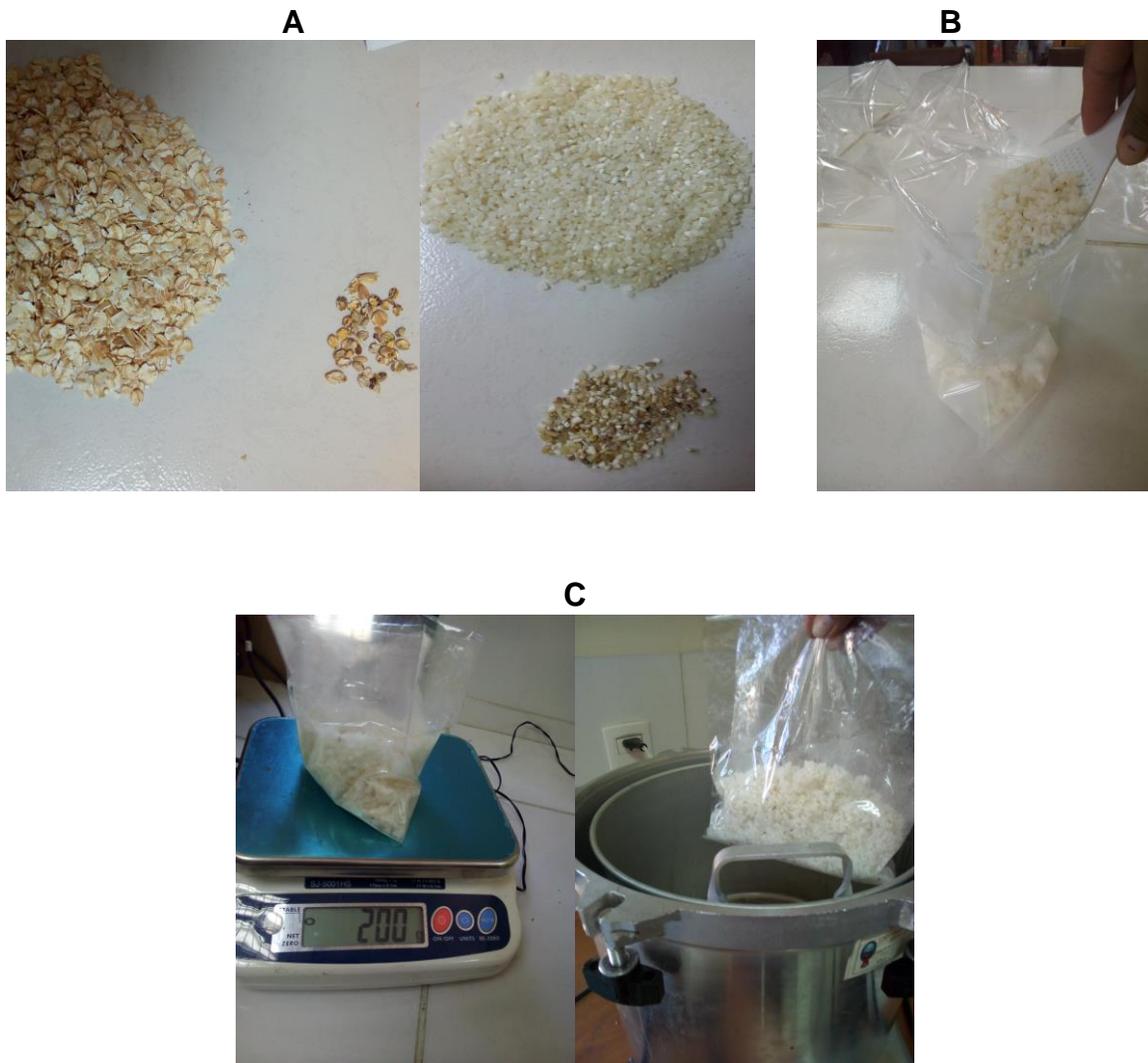


Figura 7. A) Selección de impurezas. B) Embolsado. C) El pesaje y autoclavado de las bolsas.

5.2.4. Inoculación de las cepas de *Beauveria bassiana*

En la inoculación de las cepas se debe de realizar previamente la esterilización en la cámara flujo laminar con rayos UV durante 15 minutos; todos los implementos de laboratorio a utilizar.

Se realiza el raspaje de la cepa madre con el aza de platino previamente ya flameada, realizando la inoculación a las bolsas de los sustratos, se las sello nuevamente, y tomando registro de los datos. Las bolsas inoculadas se las agitaron para su diseminación total de las cepas y aceleración en la germinación.

El seguimiento se realizó durante 21 días, observando con factibilidad su esporulación de conidias.

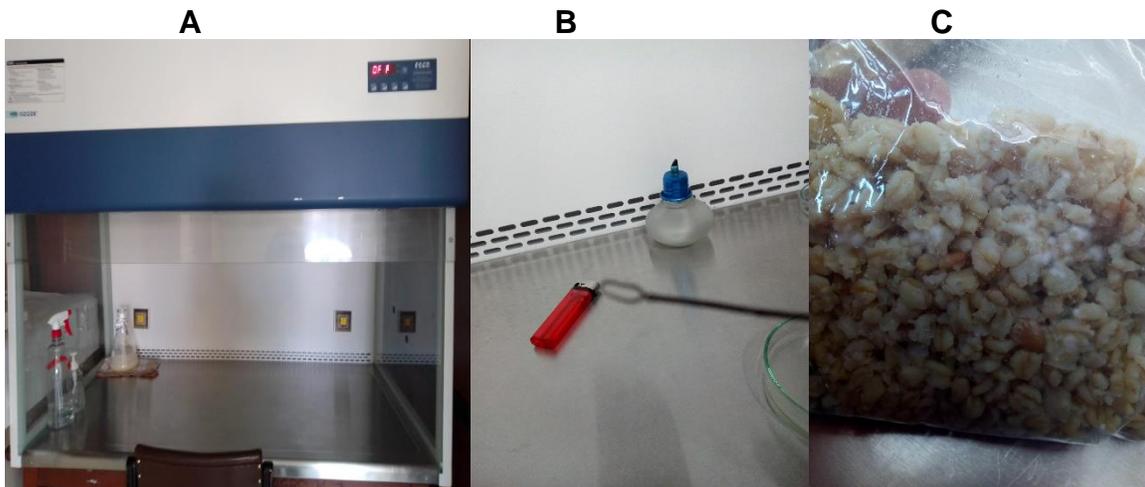


Figura 8. A) Cámara flujo laminar. B) El aza de platino previamente flameada para la inoculación. C) Esporulación de la *Beauveria bassiana* en el sustrato del trigo.

5.2.5. Secado y cosecha del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*

Luego de tres semanas se vaciaron las bolsas en bandejas, para que sequen a temperatura ambiente.

Para su cosecha realizamos la frotación de los granos, seguidamente pasamos por una zaranda para extraer el polvillo (hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*).

Monzón (2001), resalta que al finalizar el proceso de producción se procede a evaluar el rendimiento, el cual se refiere a la calidad de granos en polvo cosechado y el número de conidias gramo de polvo cosechado.

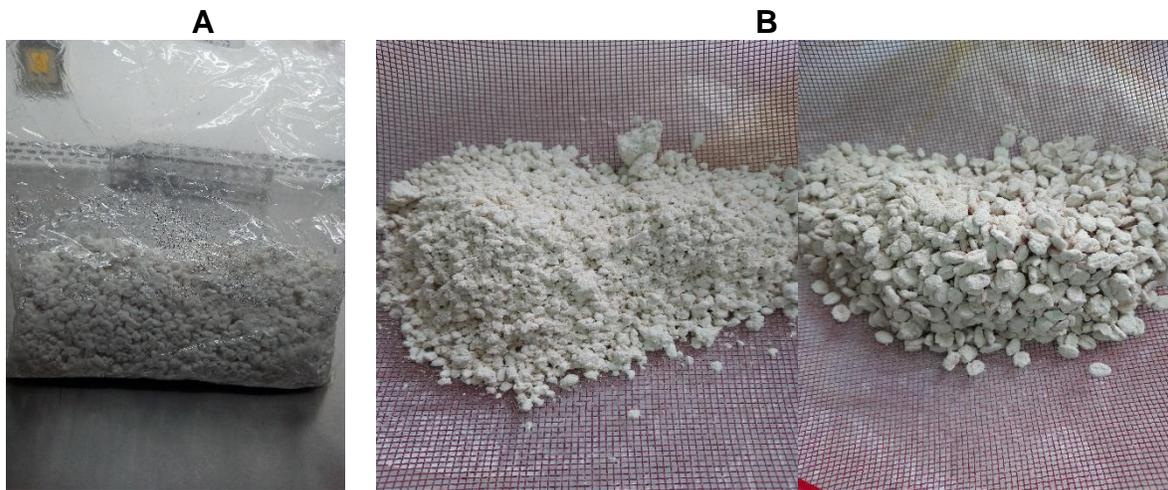


Figura 9. A) Bolsa de sustrato lista para la cosecha. B) Cosecha del sustrato del arroz y trigo.

5.2.6. Evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*

Para realizar la evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, pesamos 0,5 gramos del polvillo de *Beauveria b.* cosechada. Previamente se preparan tubos de ensayo, con 10 ml de agua destilada.

Monzón (s. f.) recomienda la preparación de diluciones en serie de 10^{-1} – 10^{-6} , se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril un ml de la solución al siguiente tubo que contiene 9 ml, agitando durante 1 min, esta operación se repite hasta 10^{-6} . Como se muestra en la (Figura 10)

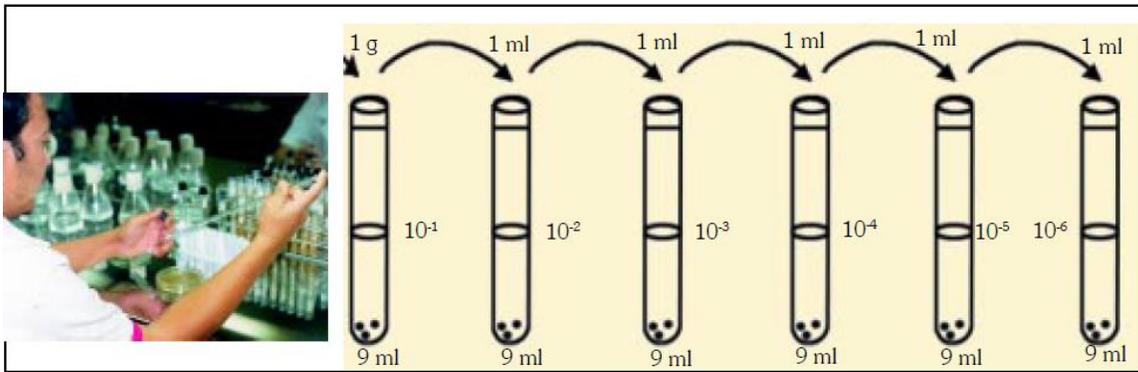


Figura 10. Preparación de las disoluciones.

La muestra pesada de la *Beauveria b.* se introduce al agua destilada, se agita durante 2 min para su disolución. De esta dilución se extrae 1 ml y se pasa al siguiente tubo de ensayo; este procedimiento se siguió hasta la disolución 6.

De cada disolución se puso aproximadamente 0.001mm, en la cámara de Neubauer, donde consta de dos retículos cada uno consta de nueve cuadrantes, cada cuadrante tiene 25 celdillas y cada una de 16 mini celdillas.

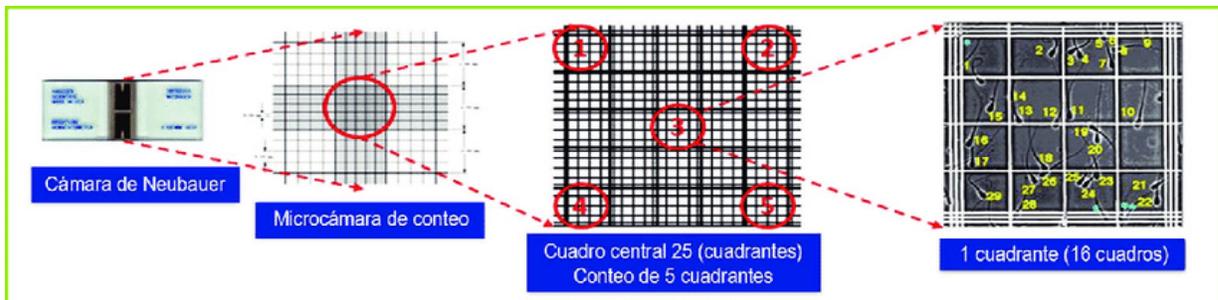


Figura 11. Descripción de la cámara de Neubauer.

El conteo se realizó de un cuadrante (Figura 12) donde se tomaron cinco celdillas como promedio para el conteo, las disoluciones colocadas en la cámara se observaron por el microscopio, llegando al factor de 40X.



Figura 12. Conteo de conidias.

El conteo de las conidias se realizó de los tubos de ensayos con en el número de disolución más visibles de contar.

La viabilidad se tomó en cuenta sembrando la cepa en el medio de cultivo de PDA, dejando por 24 hrs, pasado el tiempo se cortó en pequeñas alícuotas, seguidamente se observa por el microscopio.



Figura 13. Conidias germinadas.

Para el cálculo de concentración de conidias se obtuvo el promedio del conteo de los cuadrantes y las diferentes repeticiones; obteniendo el resultado final.

5.3. Variables de respuesta

De los resultados obtenidos, considerándose de gran importancia se tomaron las siguientes variables de respuesta.

- **Tiempo del sustrato**

Observando el comportamiento del porcentaje de crecimiento del hongo, durante los 21 días, denotándose sus cambios físicos, tanto en los sustratos como en el medio de cultivo.

- **Crecimiento**

El crecimiento se determinó por el porcentaje de desarrollo poblacional de la *Beauveria bassiana*. Donde su procedimiento se dio en diferentes categorías de cuatro divisiones.

Registrando que sustrato presenta mayor desarrollo de estructuras morfológicas de cepas.

- **Peso**

Una vez realizado la cosecha, se obtuvo la *Beauveria* en polvo blanco, se procedió a pesar cada bolsa obteniendo el peso total de cada sustrato.

- **Viabilidad**

Para la viabilidad se preparó el medio de cultivo de PDA, inoculado de *Beauveria* se dejó por 24 hrs, a partir de esto se observó mediante el microscopio su germinación y se cuantificó su viabilidad.

El porcentaje de viabilidad se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Conidias Germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ de Conidias Totales}} \times 100$$

- **Concentración**

La concentración se realizó con la disolución de cepas de *Beauveria bassiana* en agua destilada, usando la cámara de Neubauer y usando la siguiente fórmula.

$$C = N \times \text{Dilución empleada} \times \text{factor de cámara}$$

Donde:

C = concentración que se desea conocer

N = número promedio de esporas por cuadrante

factor de cámara = 40X

- **Costos de producción**

El costo de producción se obtuvo por el material e insumos utilizados con mucha frecuencia, excepto que algunos insumos no fueron contados por motivo que se proporcionó en el mismo laboratorio, el costo se evaluó por bolsa de producción.

5.4. Diseño experimental

En el experimento realizado se utilizó el DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR CON DOS FACTORES, teniendo nueve tratamientos con tres repeticiones, con un total de 27 unidades experimentales.

5.4.1. Modelo lineal

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Una observación cualquiera.

μ = Media general.

α_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor A.

β_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor B.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción del i -ésimo nivel del factor A con el j -ésimo nivel del factor B.

ε_{ijk} = Error experimental.

5.4.2. Factores de estudio

Cuadro 1. Factores de estudio.

Factor A: Sustratos	Factor B: Cepas de Beauveria
A ₁ = Arroz	B ₁ = Cepa local
A ₂ = Trigo	B ₂ = Cepa 24
A ₃ = Avena	B ₃ = Cepa 13

5.4.3. Tratamientos

$$T_1 = A_1 B_1$$

$$T_2 = A_1 B_2$$

$$T_3 = A_1 B_3$$

$$T_4 = A_2 B_1$$

$$T_5 = A_2 B_2$$

$$T_6 = A_2 B_3$$

$$T_7 = A_3 B_1$$

$$T_8 = A_3 B_2$$

$$T_9 = A_3 B_3$$

5.4.4. Croquis del experimento

Cuadro 2. Croquis del experimento.

	Tratamientos								
I	T 6	T 7	T 4	T 9	T 3	T 6	T 4	T 1	T 2
II	T 5	T 3	T 1	T 7	T 4	T 5	T 1	T 9	T 7
III	T 2	T 2	T 6	T 8	T 5	T 3	T 8	T 9	T 8

5.4.5. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se usaron las diferentes pruebas: Análisis de varianza, análisis de interacción entre factores y Duncan.

Donde los datos se tabularon e interpretaron en cuadros y figuras.

Con la verificación del coeficiente de variación, comprobando el rango de aceptación.

Para el cual se usó el programa de Info Stat, con el cual se realizó la tabulación de los datos

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. Resultados

6.1.1. Características de comportamiento de inoculación en el medio de cultivo

La inoculación en el medio de cultivo sintético Papa Dextrosa Agar, (PDA) se dio con crecimiento abundante, en las cajas petri.

En cuanto a la contaminación de medios se observó el hongo saprofito *Aspergillus sp*, descartando inmediatamente estos medios contaminados.

Su desarrollo se dio a los 12 días, de manera normal, con características visibles de coloración de amarillo cremoso a cremoso intensos, teniendo la consistencia algodonosa.

Con anillos concéntricos, teniendo crecimiento basal y aérea llegando hasta la superficie de la caja petri, sin ningún problema de crecimiento lento. Como se muestra en la siguiente (figura 14)

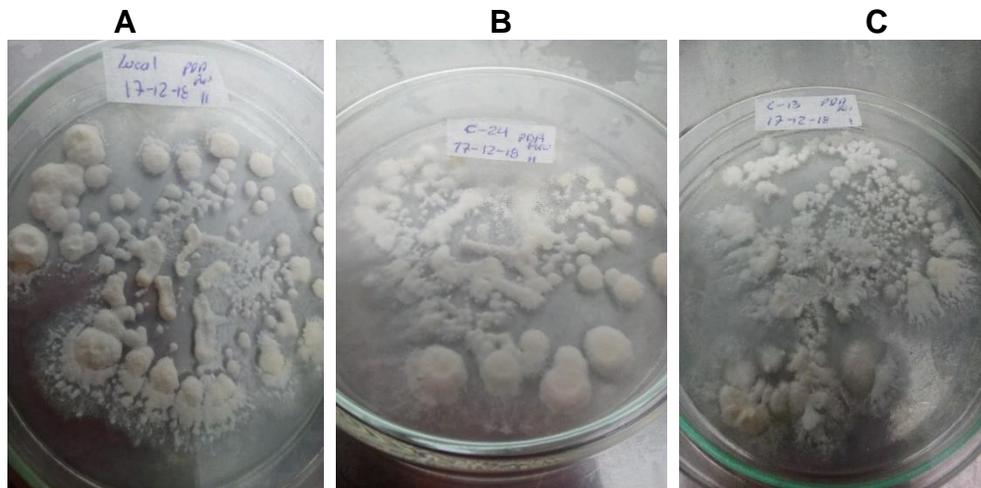


Figura 14. *B. bassiana* en medio de cultivo PDA: A) C- Local, B) C- 24, C) C- 13

Gómez et al. (2014) considera que las características son: Colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálido, incoloras al reverso, amarillas o rojizas en medio Papa-Dextrosa-Agar, o Agar de papa.

Desde el punto de vista de Foronda. (2009) Los tratamientos que mostraron un mejor desarrollo adecuado en corto tiempo es en el medio nutritivo de PDA.

Por otro lado, Monzón. (s.f.), demuestra que el crecimiento y producción del hongo en platos petri, entre 4 a 6 días el hongo entomopatígeno ya se desarrolla completamente en el medio de cultivo de PDA, durante este periodo se observa el crecimiento del micelio y la producción de conidias.

6.1.2. Características de comportamiento de inoculación en los sustratos

Las cepas de la *Beauveria bassiana* presentaron las siguientes fases: 1) Germinación de conidias; 2) Inicio de micelio de aspecto algodonoso abundante, no muy compactas con sus coloraciones; 3) Cubrimiento de micelio de forma abundante y compacta; 4) Conidiogénesis, con formación de conidióforos y conidias del hongo; 5) Liberación de conidias, de aspecto pulverulento.

Desde el primer día que se realizó la inoculación se dio el seguimiento de los sustratos, donde:

Se vio el crecimiento y desarrollo del hongo entomopatógeno, tomando datos hasta los 21 días consecutivos, la medición se realizó por separación de cuadrantes observándose el porcentaje de crecimiento del micelio, y con medias de promedios se obtuvieron los datos finales.

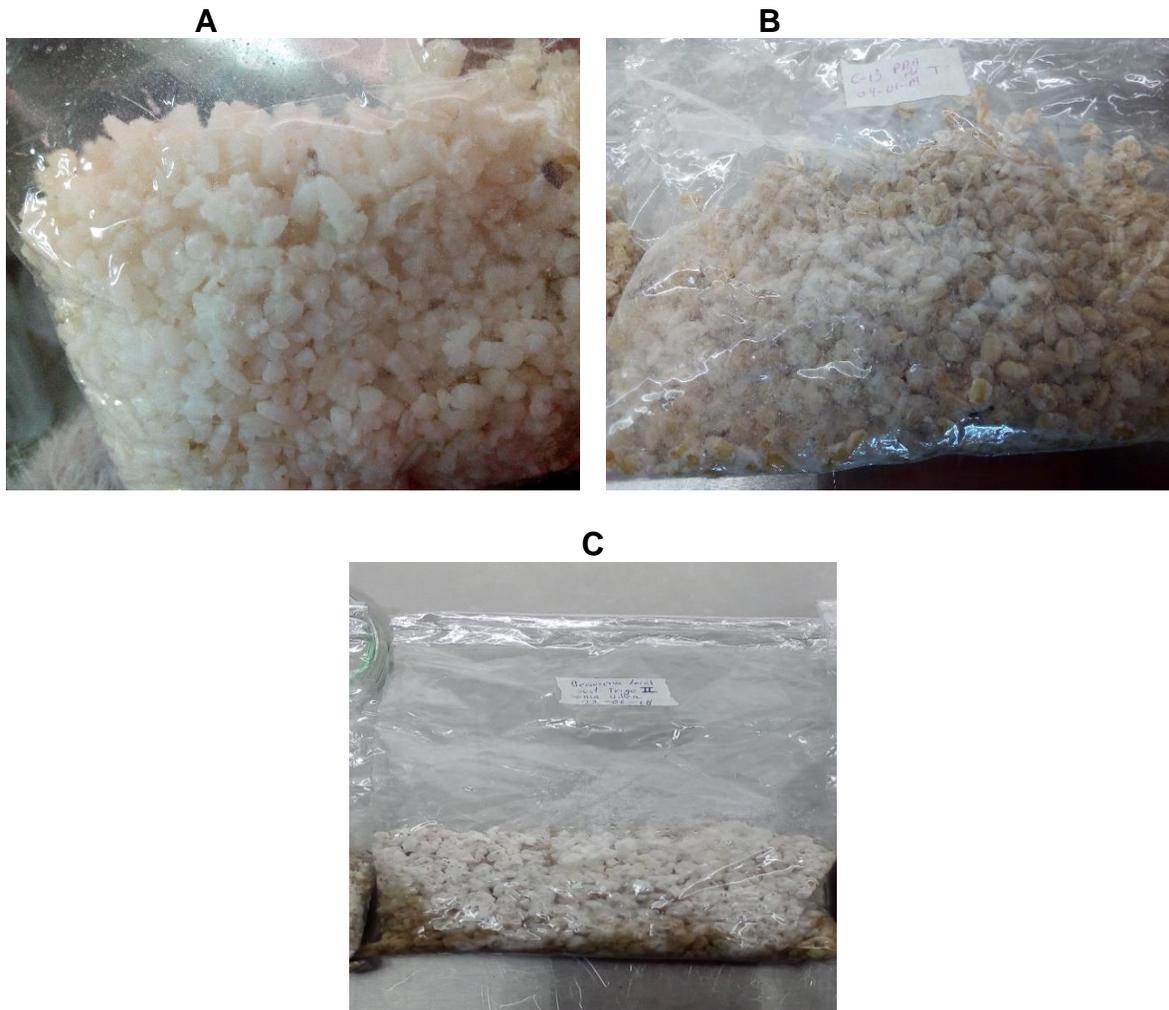


Figura 15. Desarrollo del hongo: A) sustrato de arroz, B) sustrato de avena y C) sustrato de trigo.

Del mismo modo Monzón (s. f.), empleando las palabras de (Humphreys y coautores 1989, Sarh, 1994 citado por Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1997), señalando que las conidias aéreas de entomopatógenos se obtiene masivamente en cultivos de sustratos sólidos, generalmente granos precocidos.

A su vez la (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1997) citada por Monzón (2001), señala que las condiciones ambientales y otros factores influyen en la morfogénesis de los hongos como: la temperatura, pH, relación C/N, actividad del agua, concentraciones del oxígeno, condiciones de iluminación.

De igual manera Castillo, *et al.*, (2012), muestra que presentaron colonias de aspecto algodonosa al principio, que luego se tomaron pulverulentas con superficie semielevadas y crecimiento moderado; donde las colonias presentaron color blanco que durante el crecimiento micelial fue tomando un color amarillento.

6.1.2.1. Porcentaje de desarrollo de las cepas a los 12 días

Los resultados obtenidos nos muestran un mayor porcentaje de desarrollo del hongo en el sustrato de arroz, seguido del trigo y avena.

Por tanto, se observa que el mejor sustrato es el arroz con el promedio más alto en cuanto a su porcentaje de mayor crecimiento del hongo; a su vez, en el desarrollo de las cepas se verifica que el mejor crecimiento es la cepa -24, el mismo, en los diferentes sustratos tuvo mayor porcentaje en su crecimiento.

Los promedios bajos en sustrato se observaron en avena, y en cuanto a las cepas se observó la cepa -13 en arroz y la cepa local en la avena y trigo.

En el cual las cepas que dieron mayor porcentaje es la cepa - 24 en arroz con un promedio de 81,67%, en el sustrato del trigo el mayor promedio es de 65% y en avena con 55%; el menor porcentaje en arroz con la cepa -13 con 71,67% y la cepa local en trigo 45% y 30% en avena. Como nos muestra en la siguiente (figura 16).

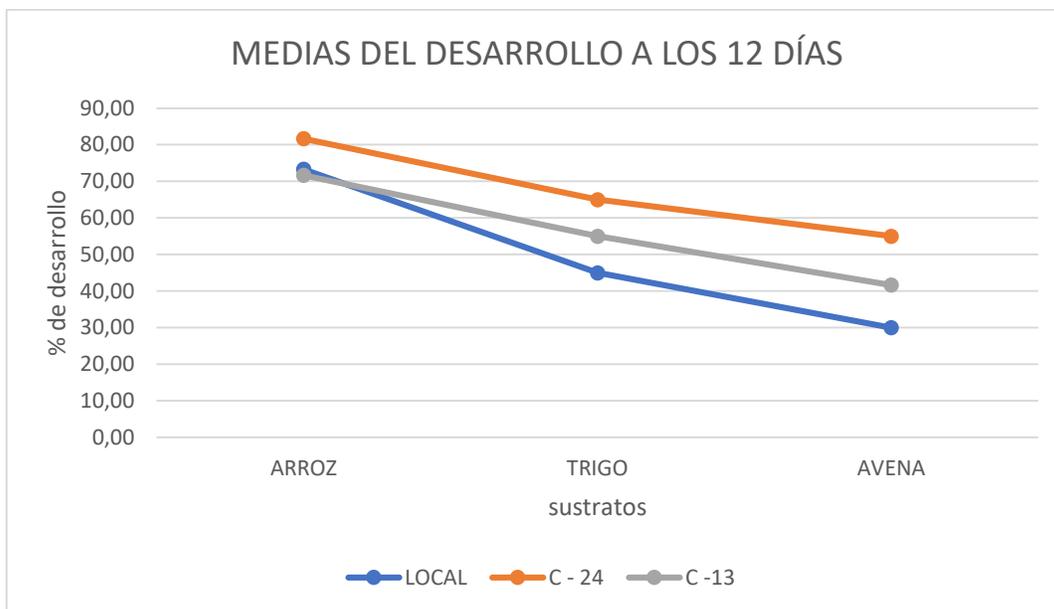


Figura 16. Medias de desarrollo del hongo entomopatígeno.

Foronda (2009) da a conocer que el crecimiento en desarrollo del hongo entomopatígeno es adecuado en 12 días.

En cuanto al desarrollo de los cultivos es favorecido si la temperatura predominante del cuarto de maduración está entre 25° y 30°C. en estas condiciones los cultivos pueden completar su desarrollo en un promedio de 12 días. Haciendo notar Antía et al. (1992).

Así mismo Bahamón, *et al.*, (s. f.), nos muestra que el rango del desarrollo de las cepas, durante las primeras semanas se encuentra entre 70% a 85%, en granos precocidos, y con las adecuadas condiciones.

6.1.2.1.1. Análisis de varianza a los 12 días de desarrollo

En el cuadro se puede observar que hay diferencia entre los factores A y B, mostrándonos que hay independencia entre los sustratos y las cepas, demostrando que la interacción de los factores permite alcanzar diferencia de porcentaje de desarrollo de hongos en los sustratos.

El coeficiente de variación nos da un 7.28 %, el cual nos demuestra que tuvimos un buen manejo de las unidades experimentales.

Cuadro 3. Análisis de varianza a los 12 días de desarrollo.

F. V.	SC	GL	CM	F	P – valor
SUSTRATO	5090,74	2	2545,37	144,68	<0,0001 *
CEPA	1451,85	2	725,93	41,26	<0,0001 *
SUST *CEP	259,26	4	64,81	3,68	0,0232 *
ERROR	316,67	18	17,59		
TOTAL	7118,52	26			

CV=7.28

Debido a la independencia de los factores realizamos las pruebas Duncan. Con las medias de los sustratos y cepas. Como se vio en el (Cuadro 3) a continuación, se ve la diferencia entre el mejor y menor porcentaje de desarrollo de las cepas.

Cuadro 4. Prueba Duncan con error de 1,40.

SUSTRATO	MEDIAS	DUNCAN
ARROZ	75,56	A
TRIGO	55,00	B
AVENA	42,22	C
CEPA	MEDIAS	DUNCAN
C-24	67,22	A
C-13	56,11	B
LOCAL	49,44	C

De acuerdo con Alberto (2016), El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, tiene un promedio de infestación de 51,95% y 45,75% respectivamente en condiciones medianamente favorables.

El cuál nos indica que estamos con un buen manejo, superando los promedios citados, donde los rendimientos más bajos se encuentran en los parámetros.

6.1.2.2. Porcentaje de desarrollo de las cepas a los 21 días

De igual manera se observó el porcentaje del desarrollo de las cepas a los 21 días, semejantemente ocurre igual al de porcentaje de desarrollo de 12 días, en el cual el mejor sustrato es el arroz, seguidamente del trigo y avena.

En cuanto a las cepas el mayor porcentaje de desarrollo de cepas se dio con la cepa -24 con un promedio de 96,67% en arroz, 71,67% en trigo y 60% en avena; la cepa que tuvo menor incidencia es la cepa -13 en arroz con 91,67% y la cepa local en trigo con 50% y 33,33% en avena.

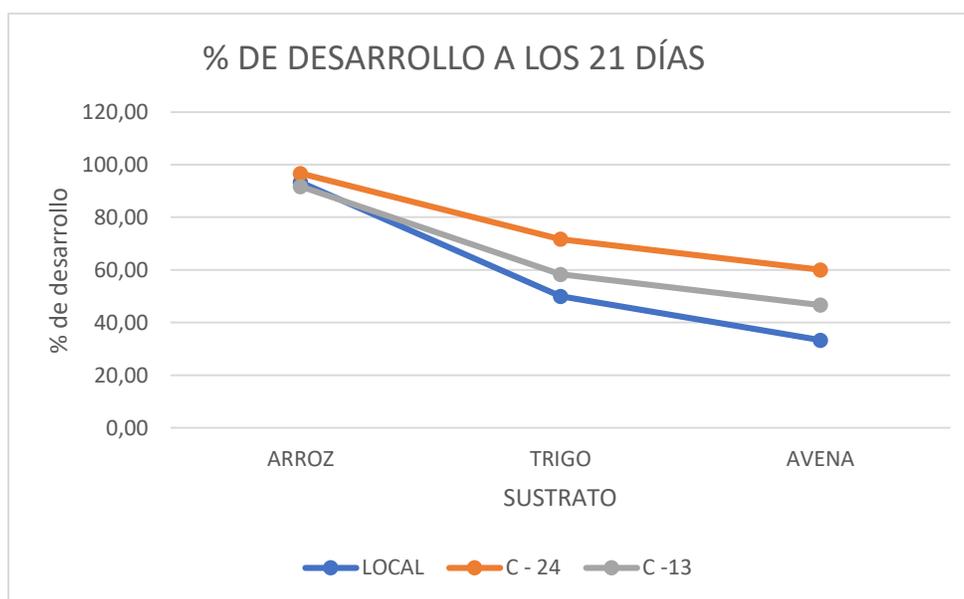


Figura 17. Porcentaje de desarrollo a los 21 días.

6.1.2.2.1. Análisis de varianza a los 21 días de desarrollo

Se puede observar que los factores de sustrato no son dependientes, mostrando que su interacción es significativa, lo cual significa, que tanto el sustrato como la cepa si son influyentes en su porcentaje de desarrollo.

Teniendo en cuenta con el coeficiente de variación que nos dio de 3,81%, que nos indica que si llevamos un buen manejo en el laboratorio.

Cuadro 5. Análisis de varianza a los 21 días de desarrollo.

F. V.	SC	GL	CM	F	P – valor
SUSTRATO	10668,52	2	5334,26	823,00	<0,0001 *
CEPA	1357,41	2	678,70	104,71	<0,0001 *
SUST *CEP	464,81	4	116,20	17,93	<0,0001 *
ERROR	116,67	18	6,48		
TOTAL	12607,41	26			

Por consiguiente, elaboramos las pruebas Duncan, demostrando con las medias tanto de sustrato y cepas, de cuál es el mejor promedio de desarrollo de las cepas.

Cuadro 6. Pruebas Duncan con error de 0,85

SUSTRATO	MEDIAS	DUNCAN
ARROZ	93,89	A
TRIGO	60	B
AVENA	46.67	C
CEPA	MEDIAS	DUNCAN
C-24	76,11	A
C-13	65,56	B
LOCAL	58,89	C

En general se observó las comparaciones de los que tuvieron los mejores resultados al porcentaje de crecimiento del desarrollo de las cepas de *Beauveria bassiana*.

Cohela (2009), sostiene que la producción expresada en porcentajes según cepas para su distribución y producción fue la siguiente: cepa 24 con 87% y la cepa 13 con 13.65%.

La producción de hongos entomopatógenos como la *Beauveria bassiana*, llega a un punto alto de su desarrollo en promedio de 20 a 25 días de crecimiento, con

promedios de 85% a 95%, con temperaturas que oscila de 23° a 27°. (Lucero et al. 2004).

A su vez Alves (1986), cómo se citó en Monzón (s. f.), indicando que los entomopatógenos presentan una viabilidad genética recurrente de heterocariosis que resulta con diferentes grados de patogenicidad, virulencia, especificidad, producción de conidias y resistencia a factores abióticas.

6.1.2.3. PESO DE LAS CONIDIAS

En cuanto a la realización del pesado, se extrajo la mayor cantidad del polvillo, conidias de *Beauveria bassiana*, el sustrato del arroz presento la mayor cantidad en gramos, cumpliéndose los 21 días de estudio; mientras en los sustratos de trigo y avena presentaron menor pesaje en gramos, debido este por la oxidación de los sustratos por la misma razón se realizó el secado a los 15 días.

El mejor rendimiento es del sustrato del arroz, seguido del trigo y avena. En cuanto a la cepa con el mejor promedio es la cepa -24, de 7,17 g en arroz, 4,60 g en trigo y 3,74 g en avena.

Los promedios más bajos se dieron en la cepa -13, con 5,36 g en arroz, y la cepa local en trigo con 1,71 g y 1,48 g en avena.

Peso del polvo cosechado por kilogramo de arroz, el rendimiento puede variar de 20 gramos, hasta 80 o más gramos de polvo por kilogramo de arroz utilizado en todo el proceso de producción de bolsas y matrices. Monzón (s. f.)

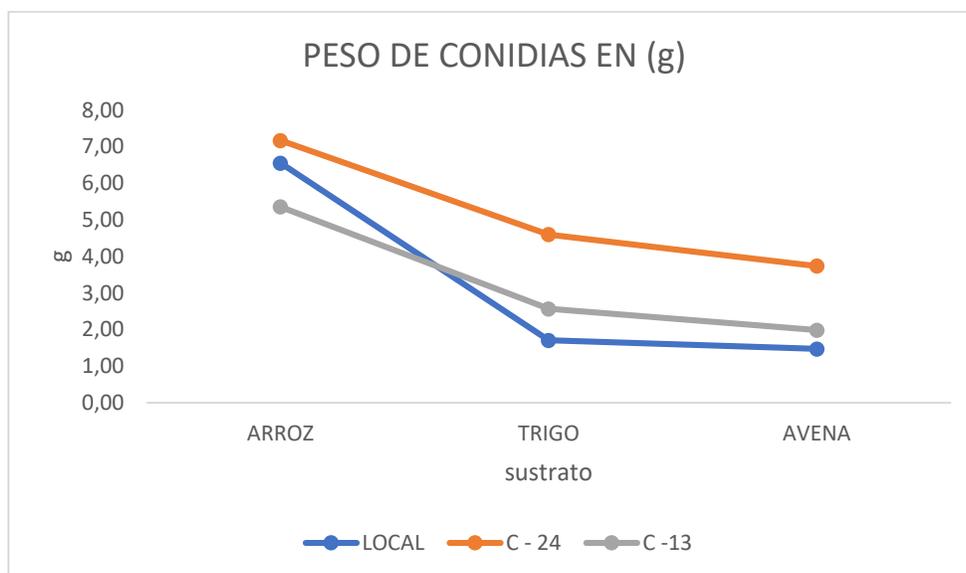


Figura 18. Peso de las conidias.

Donde la C -24 con sustrato de un kilogramo de arroz genero 71, 70 g de *Beauveria*, este resultado muestra que se está dentro del parámetro.

6.1.2.3.1. Análisis de varianza del peso de conidias en gramos

En relación a los factores se observan que los factores son independientes, por la misma razón su interacción muestra significancia. Donde cada factor no influye al otro factor.

Demostrando que se hizo un buen manejo de las unidades experimentales obteniendo un porcentaje de 7.98%

Cuadro 7. Análisis de varianza del peso de conidias en gramos.

F. V.	SC	GL	CM	F	P - valor
SUSTRATO	82,61	2	41,30	424,39	<0,0001 *
CEPA	21,54	2	10,77	110,65	<0,0001 *
SUST *CEP	5,23	4	1,31	13,42	<0,0001 *
ERROR	1,75	18	0,10		
TOTAL	111,12	26			

Por lo tanto, mostraremos las comparaciones de la media en la prueba Duncan, en sustrato y cepas, donde nos detallara el que obtuvo el mayor peso y el del menor peso.

Cuadro 8. Prueba Duncan con un error de 0,10.

SUSTRATO	MEDIAS	DUNCAN
ARROZ	6,36	A
TRIGO	2,96	B
AVENA	2,40	C
CEPA	MEDIAS	DUNCAN
C-24	5,17	A
C-13	3,31	B
LOCAL	3,25	B

Mientras que Narváes et al. (1997), manifiesta que la producción en matrices de sustratos de arroz por kilogramo tiene un rendimiento de 60 gramos a 90 gramos.

Mostrándonos que el sustrato del arroz alcanza los rangos establecidos de 63,60 gramos por kilogramo de sustrato.

Es posible que la esporulación de los aislamientos del hongo *B. bassiana* en el arroz haya sido favorecida por las condiciones nutricionales que el sustrato ofrece, pues de acuerdo con (Olarte 1993), el arroz como cereal presenta una composición de 0,7% grasa, 1,5% fibra, 1,2 %minerales, y 74,4% carbohidratos. Mencionado por Narváes et al. (1997)

6.1.2.4. NÚMERO DE CONIDIAS

Se realizó el conteo de conidias en el microscopio con la cámara de Neubauer, donde se observa con el mayor número de conidias de la cepa -24, en arroz con $1,16E+08$ conidias/ml; en trigo con $1,04E+08$ conidias/ml y $9,22E+07$ conidias/ml en avena.

Con el menor número de conidias está la cepa -13 en arroz con $6,78E+07$ conidias/ml, y la cepa local en $6,25E+07$ conidias/ml en trigo y $5,46E+07$ conidias/ml en avena.

Monzón (2001), destaca que: el conteo de conidias por gramo de polvo cosechado, el rendimiento está determinado por la cepa y por el estado de la misma y varía desde 5×10^3 hasta $2,5 \times 10^{11}$ conidias/ml, generalmente las cepas de *B. Bassiana* tiene mejor rendimiento.

Por consiguiente, se observa que los resultados se encuentran en los parámetros indicados.

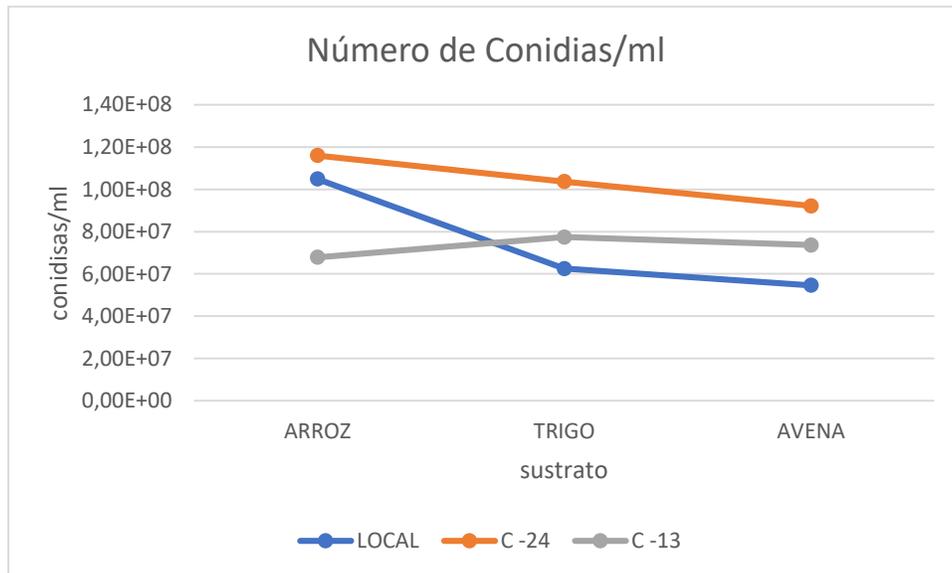


Figura 19. Número de conidias sobre mililitro.

Teniendo en cuenta a Gonzáles et al. (1993) citado por Narváes et al. (1997), estimaron la producción de esporas promedio de algunos aislamientos de *B. bassiana*, obteniendo entre $2,5$ y $8,8 \times 10^6$ esporas.

Mientras que Pelaez et al. (1994) mencionado por Narváes et al. (1997), da a conocer los estudios al desarrollo de *B. bassiana*, bajo condiciones controladas de tiempo, luz temperatura. La máxima concentración de esporas se obtuvo de arroz $2,2 \times 10^9$ esporas/g.

6.1.2.4.1. Análisis de varianza del número de conidias/ml

Se observa que entre los factores no existe dependencia por ende estos son independientes. Tanto en la interacción de los factores son significativos, estos resultados nos dan un coeficiente de 6,75%, donde nos indica que si hubo un buen manejo en los factores.

Cuadro 9. Análisis de varianza del número de conidias sobre mililitro.

F. V.	SC	GL	CM	F	P - valor
SUSTRATO	2,44 E+15	2	1,22 E+15	38,27	<0,0001 *
CEPA	5,60 E+15	2	2,80 E+15	87,70	<0,0001 *
SUST *CEP	2,97 E+15	4	7,43 E+14	23,26	<0,0001 *
ERROR	5,75 E+14	18	3,19 E+13		
TOTAL	1,15 E+16	26			

Mostraremos a continuación las pruebas Duncan donde nos detallara las medias de los factores, en donde tienen los mejores promedios y los más bajos entre los factores de sustrato y cepa.

Cuadro 10. Prueba Duncan con el error de 1,8E+6

SUSTRATO	MEDIAS	DUNCAN
ARROZ	9,64 E+7	A
TRIGO	8,12 E+7	B
AVENA	7,34 E+7	C
CEPA	MEDIAS	DUNCAN
C-24	1,04 E+8	A
C-13	7,40 E+7	B
LOCAL	7,29 E+7	B

De acuerdo con Lucero et al. (2004) nos señala que las cepas de *Beauveria*, aprovechando los nutrientes que le proporcionó el trigo, crecieron cubriendo totalmente el sustrato con hifas y esporas, presentando las siguientes

concentraciones de esporas por gramo de trigo: $2,5 \times 10^8$ esporas/g a $5,0 \times 10^9$ esporas/g.

Por tanto, las medias de sustratos con mejor resultado es el arroz haciendo diferencia con el trigo donde no llego a su parámetro indicado y la avena que obtuvo el menor rendimiento.

En cuanto a las cepas el que mejor desarrollo en crecimiento es la C -24 diferenciándose de la C-13 y local que obtuvieron el mismo rango.

6.1.2.5. Viabilidad de las conidias

Se contabilizo las conidias germinadas pasada las 24 hrs de su inoculación a las cajas petri, donde se obtuvo la viabilidad del 89%.

Teniendo en cuenta a Poma (2011), que hace referencia a (Marín 1994), sobre la germinación de conidias en laboratorio, debe ser superior al 85% en un tiempo de incubación de 12 a 24 horas.

Por lo que se considera una buena formulación, tomando en cuenta lo que plantean (Vélez et al., 1997) citado por Espinoza y Vallejos (2016), quienes señalan que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas.

6.1.2.6. Costos de producción

En cuanto a la elaboración de costos de producción masiva de la *Beauveria bassiana* en los diferentes sustratos, se tomó en cuenta de la producción general del número de bolsas en bolivianos; finalmente tomando el costo por unidad de bolsa de 100 g en Bs.

El costo de la reactivación se fue promediando en los diferentes costos de los demás sustratos.

Teniendo en cuenta la referencia del laboratorio de la venta del producto por bolsa de 200 g (cepa/sustrato) se lo realiza en Bs 20; los productos obtenidos serán evaluados a Bs 10 / 100 g la bolsa. En el siguiente cuadro se observa el costo de los sustratos.

Cuadro 11. Costo de los diferentes sustratos.

Sustrato	Costo del sustrato en Bs/kg	Costo por bolsa/bs	Costo por bolsa con cepas (bs)
Arroz	6	3,41	10
Trigo	5	3,30	10
Avena	5	3,30	10

De igual manera se tomará el mayor promedio del peso de las cepas con 7,17 g, ya que el mismo se encuentra en el parámetro de producción. Bajo este dato se realizará el beneficio costo.

En cuanto a la producción con el sustrato de arroz, es el más eficiente dando los mejores resultados; en los sustratos de trigo y avena los resultados fueron ineficientes.

Entre las cepas de *Beauveria bassiana*, la que mejor producción dio es la cepa -24 en los tres sustratos, seguido de la cepa -13 y cepa local.

El de la mayor producción es del sustrato de arroz con la cepa -24 con Bs 6,59; seguido de la cepa local con Bs 5,73 y cepa -13 con Bs 4,05.

Mientras tanto en el sustrato del trigo se tiene la producción de costo de la cepa -24 con Bs 3,12; seguido de las cepa -13 y cepa local con Bs 0,28; - 0,92.

En el sustrato de la avena se dio de igual manera mejor rendimiento en la cepa -24 con su beneficio de Bs 1,92; en tanto en las cepas -13 y local se ve una pérdida de producción con Bs – 0,52 y – 1,25.

Entonces se evaluó el beneficio costo de los diferentes sustratos, donde Rodríguez (2020), nos indica tomar los siguientes parámetros:

- B/C mayor a 1: quiere decir que los ingresos son superiores a los costos, por lo que el proyecto es rentable.

- B/C igual a 1: significa que no hay ni ganancias ni pérdidas, ya que uno absorbe al otro, así el proyecto no es viable.
- B/C menor a 1: indica que los costos sobrepasan a los beneficios por lo que el proyecto no es rentable.

A continuación, se muestra el detalle del Beneficio /Costo.

Cuadro 12. Cuadro del beneficio costo de los sustratos.

B/C	C – 24	C – 13	C - local
Sustrato arroz	2,93	2,19	2,68
Sustrato trigo	1,95	0,78	0,72
Sustrato avena	1,58	0,84	0,62

En el cuadro se observa que el 55% los ingresos son superiores a los costos, por lo que el proyecto es rentable.

7. CONCLUSIONES.

Por consiguiente, a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se llega a las siguientes conclusiones:

- Los medios de cultivo sintético PDA, respondieron bien con el desarrollo, donde su crecimiento se fue dando de manera normal.
- El sustrato que dio mejor en su desarrollo de cepas de *Beauveria bassiana* es el arroz seguidamente del trigo y avena, en el cual se usó arrocillo el cual ya tiene referencia de mayor almidón y mejor absorción de humedad.
- En tanto los sustratos de avena y trigo no respondieron al desarrollo de las cepas, por tener mayor cantidad de nutrientes no digeribles por el hongo *Beauveria bassiana*.
- En cuanto a la observación de porcentaje del desarrollo de la cepa *Beauveria b.* se dio en el sustrato de arroz, llegando a una media de 96,67% con la cepa -24, esta cepa es quien dio los mejores promedios en los diferentes sustratos de trigo y avena.

- De la misma forma en el pesaje de las conidias quien obtuvo los mejores resultados es el sustrato del arroz y la cepa -24, teniendo 7,17 g de conidias, con el pesaje más bajo se quedó el sustrato de avena con la cepa local de 1,48 g de conidias.
- A sí mismo en el número de conidias por mililitro quien dio el mejor resultado es el sustrato del arroz con la cepa -24 de 1,16E+08 conidias / ml, de igual manera con los más bajos resultados es el sustrato de avena con la cepa local de 5,46E+07 conidias / ml.
- Por tanto, se observó de manera general de los mejores resultados tanto en sustrato como cepas son el arroz y la cepa -24.
- El uso del hongo entomopatógeno producido, está apto para el campo, debiéndose que se encuentra entre los parámetros de viabilidad del 89%.
- En los costos de producción se concluye que el mejor rendimiento mostro la cepa 24 en el sustrato de arroz, el cual nos produce buena ganancia en ventas, así mismo la cepa 13 y local están en ese rango de beneficio.
- En tanto el sustrato de trigo y avena no producen ningún beneficio, por no llegar a desarrollarse completamente por la oxidación.

De manera general se concluye que hubo un manejo aceptable, ya que no todos los sustratos rindieron de la mejor forma, en el último análisis del beneficio costo se tiene con más del 50 % se sustentabilidad.

8. RECOMENDACIONES.

En base a las conclusiones obtenidas se mencionan las siguientes recomendaciones para continuar con los estudios relacionados:

- Para la reproducción de las cepas en los diferentes sustratos se recomienda tomar en cuenta las diferencias de factores como: iluminación, intercambio gaseoso para evitar la oxidación de los granos.
- Realizar el estudio de los diferentes porcentajes de nutrientes en los sustratos para su óptimo desarrollo de esporulación de las cepas de *Beauveria b.*

- Considerar la verificación de la calidad de los granos del sustrato, para su mejor producción de cepas, tomando en cuenta los costos de producción para lograr el beneficio costo.
- Buscar métodos de optimización en menor tiempo para la producción masiva de hongos entomopatógenos, tanto en solidos como líquidos, para lograr el beneficio de la agricultura.
- Realizar la reproducción de cepas en mayor variación de sustratos y diferencias físicas para probar su eficiencia en la esporulación.
- Para la continuación del trabajo seguir con la adaptabilidad en campo, para probar su efectividad de viabilidad.

Evaluar la *Beauveria bassiana* en el campo de la agricultura del altiplano como en el gorgojo de los andes (*Premnotrypes spp*).

BIBLIOGRAFIA

AGÜERO, J. G., ESCOTO, J. N., Y JUÁREZ, E. A. (2009). Evaluación de la cepa 114 de *Beauveria bassiana* y la cepa, monte rosa, de *Metarhizium anisopliae* para el manejo de *Cosmopolites sordidus*. campus agropecuario 1 y 2 de la UNAN. (tesis de grado). universidad nacional de Nicaragua. León, Nicaragua, 43 p.

ALBERTO, H., A. (2016). Evaluación de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control de hormigas cortadoras de hojas (*Atta app*) en Eucalipto; Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. (Tesis de grado). Universidad Rafael Landívar. Guatemala, 41 p.

ANTÍA, L., O., P., POSADA, F., F., BUSTILLO, P., A., E., Y GONZÁLEZ, G., M., T. (1992). Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Centro Nacional de Investigación De Café, (Cenicafé), (182), 12 p.

BAHAMÓN, T., AYCARDI, E., OROZCO, J., MARÍN, P., Y BUSTILLO, A. (s. f.). Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (*bálsamo*) *Vuillemin* (*Moniliales: Moniliaceae*) contra la broca del café en diferentes sistemas. Revista Colombiana de Biotecnología. Bogotá, Colombia, 3(1), 80-90 pp.

BARAJAS, O., C., G., MORALES, R., M., D., MINEL DEL POZO, Ñ., E., RODRÍGUEZ, A., M., L., Y NUÑEZ, L., J., J. (2009). Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. Tecno ciencia. Chihuahua, México, 3(1), 33-38 pp.

BENAVIDES, M. P., Y ARÉVALO, M. H. (2002). Manejo integrado: una estrategia para el control de la broca del café en Colombia. Centro Nacional de Investigación De Café, (Cenicafé), 53(1), 39-48 pp.

BUSTILLO, P., A., E., Y MARÍN, M., P. (2002). ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café? Manejo integrado de plagas. Centro Agropecuario Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica, (63), 5 p.

Recuperado en: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36-Numero_4/4.pdf

CABALLERO, C., W. (2014). Producción y aplicación del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico de ITZM. (Informe Técnico de Residencia Profesional). Instituto Tecnológico de la Zona Maya. Ejido Juan Sarabia, Quintana Roo, México, 33 p.

CABELLO, T. (2006). Entomopatógenos y sus características. EPS/UAL, 14 p.

CAÑEDO, V., Y AMES, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú, 68 p.

CASTILLO, A., MENESES, H., SANTANDER, A., SANTANDER, G., GONZÁLEZ, E., CÁSAIRES, R., Y MÁRQUEZ, Y. (2008). Producción artesanal de *Beauveria bassiana*. Instituto de química y tecnología. LAMOFRU. Universidad de central de Venezuela, (2), 3 p.

CASTILLO, C. E., CAÑIZALEZ, L. M., VALERA, R., GODOY, J. C., GUEDEZ, C., OLIVAR, R., Y MORILLO, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo- Venezuela. Academia, 11(23), 275-281 pp.

Recuperado en:

https://www.researchgate.net/profile/Clemencia_Guedez/publication/271825762_CARACTERIZACION_MORFOLOGICA_DE_BEAUVERIA_BASSIANA_AISLADA_DE_DIFERENTES_INSECTOS_EN_TRUJILLO-_VENEZUELA/links/54d2273a0cf28370d0e1c792/CARACTERIZACION-MORFOLOGICA-DE-BEAUVERIA-BASSIANA-AISLADA-DE-DIFERENTES-INSECTOS-EN-TRUJILLO-VENEZUELA.pdf?origin=publication_detail

CHIRIBOGA, P., H., GÓMEZ, B., G., Y GARCÉS, E., K. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (*Ysaú*). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, (IICA), Paraguay, 40 p.

Recuperado en:

<http://www.iicabr.iica.org.br/wp-content/uploads/2016/05/BeauveriaBassian.pdf>

COHELA, M., R. (2009). Efectividad del entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en condiciones de campo en el municipio de Caranavi. (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, 90 p.

DELGADO, A., Y MURCIA, O., B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Revista Ambiente y Agua, 6(2), 77-90 pp.

Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92819767006>

ESCAMILLA, L., Y., SERRANO, M., M., J., Y ANGEL, C., A. (2016). Control de plagas agrícolas con entomopatógenos. Tecnológico de Estudios Superiores, Oriente del Estado de México. Los Reyes Acaquilpan, México, 10 p.

Recuperado en: <https://testlapallitesoem.wordpress.com/2016/05/13/control-de-plagas-agricolas-con-hongos-entomopatogenos/>

ESPIÑOZA, G. C., Y VALLEJOS, F. L. (2016). Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de *Beauveria bassiana* (*Bals & Vuils*) con materiales sólidos y líquidos. (Trabajo de Graduación). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, 46 p.

FLORES CHOQUEHUANCA, R. C. (2009). Evaluación de patogenicidad de cepas promisorias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (*BALSAMO*) *vuill*. Sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (*FERRARI*) en laboratorio. (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, 62 p.

FORONDA, R. (2009). Evaluación de la virulencia y patogenicidad del hongo (*Beauveria bassiana*) sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en laboratorio. (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, 91 p.

GARCÍA, G., M., A., CAPPELLO, G., S., LESHER, G., J., M., Y MOLINA, M., R., F. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico.

KUXULKAB' Revista de Divulgación, División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México, 15(27), 20-25 pp.

GÓMEZ, H. (s. f.) Aplicación de hongos entomopatógenos en el control de plagas. Ministerio de Agricultura. Perú, 73 p.

GÓMEZ, R., H., ZAPATA, G., A., TORRES, A., E., Y TENORIO, C., M. (2014). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Laboratorio de Entomopatógenos. Perú, 37 p.

GÓNGORA, B., C., E., MARÍN, M., P., Y BENAVIDES, M., P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Centro Nacional de Investigación De Café, (Cenicafé), (16), 8 p.

LUCERO, M., A., M., PEÑA, V., L., A., Y BACCA, I., Y. (2004). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeiodes). Revista Corpoica, Investigadores Programa Agrícola. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño. Pasto, Colombia, 5(1), 43-48 pp.

MEJÍA, G. M., MENJÍVAR, A. G., Y MUÑE, E. G. (2008). Evaluación de hongos entomopatógenos como biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Homóptera: Psyllidae: Triozinae) en papa (*Solanum tuberosum*) a nivel de laboratorio. (Tesis de grado). Universidad de El Salvador, San Salvador, 105 p.

MONZÓN, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Centro Agropecuario Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Fomentos de Productos Fitosanitarios. Costa Rica, (63), 95-103 pp.

MONZÓN, A. (s. f.). Producción y uso de hongos entomopatógenos. Centro Agropecuario Tropical de Investigación y Enseñanza, Nicaragua, 63 p.

MURILLO, G., R. (2014). Introducción a la Biotecnología Agrícola. Facultad de Agronomía. La paz, Bolivia, 101 p.

NARVÁES, G., M., P., González, G., M., T., Bustillo, P., A., E., Chaves, C., B., y Montoya, R., E., C. (1997). Producción de esporas de aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en diferentes sustratos. *Revista Colombiana de Entomología*. 23(2-3), 125-131 pp.

POMA, H. (2011). Reproducción masiva de conidias de cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (BALSAMO) *vuillemin* sobre sustrato natural de arroz, bajo diferentes calidades de grano. (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, 56 p.

RAMÍREZ, V., J., J. (2020). Importancia del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el control de insectos plaga en cultivos de hortalizas en la provincia de Los Ríos. (Trabajo de Titulación). Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo, Los Ríos, Ecuador, 26 p.

Recuperado en:

<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/8422/E-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000271.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

RODRÍGUEZ, G., L., A., GANDARILLA, P., F., L., MALDONADO, B., M., G., QUINTERO, Z., I., MORALES, R., L., H., ALFARO, A., J., H., Y ELÍAS, S., M. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) en cultivo bifásico. *INTERCIENCIA*. México, 42(11), 739-743 pp.

Recuperado en: <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/11/739-ELIAS-SANTOS-42-11.pdf>

SCHAPOVALOFF, M. E. (2012). Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de misiones. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina, 166 p.

TANZINI, M. R., BATISTA, A. SI., SETTEN, A., Y TOSCHI, A., N. (2001). Compatibilidad de agentes tenso activos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Manejo integrado de plagas (Costa Rica), (59), 15-18 pp.

VILLALBA, M., P., L., GRILLO, R., H., Y CUPULL, S., R. (2009). Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara, Cuba, 36(4), 25-32 pp.

Recuperado en: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36-Numero_4/4.pdf

ANEXOS

Anexo 1. Desinfección con rayos de luz ultra violeta en la cámara flujo laminar.



Anexo 2. Inoculación del hongo entomopatógeno en la cámara flujo laminar.



Anexo 3. Reactivación del hongo entomopatógeno, en brocas de café.



Anexo 4. Desarrollo de *Beauveria bassiana* en medio de cultivo PDA.



Anexo 5. Desarrollo de *Beauveria bassiana* en los diferentes sustratos: arroz, trigo y avena.



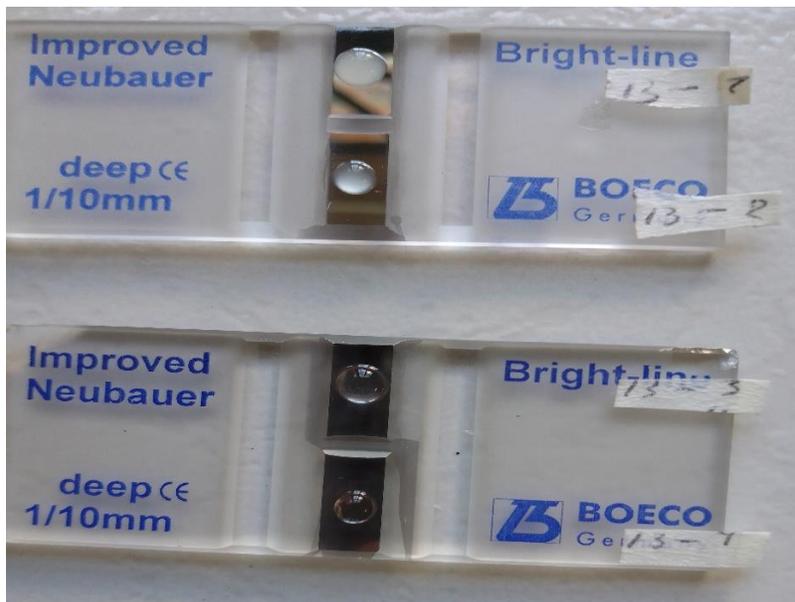
Anexo 6. Sustratos en el autoclave, y enfriamiento en la cámara flujo laminar.



Anexo 7. Disoluciones de las cepas de *Beauveria bassiana*.



Anexo 8. Cámara de Neubauer con las disoluciones para realizar el conteo de conidios.



Anexo 9. Porcentaje de desarrollo de la Beauveria bassiana a los 12 días.

SUSTRATO	CEPA	I	II	III	MEDIA	SUMA
ARROZ	LOCAL	70	75	75	73,33	220
ARROZ	C - 24	80	80	85	81,67	245
ARROZ	C -13	70	70	75	71,67	215
TRIGO	LOCAL	45	50	40	45,00	135
TRIGO	C - 24	65	60	70	65,00	195
TRIGO	C -13	55	60	50	55,00	165
AVENA	LOCAL	30	35	25	30,00	90
AVENA	C - 24	55	50	60	55,00	165
AVENA	C -13	40	45	40	41,67	125

Anexo 10. Porcentaje de desarrollo de la Beauveria bassiana a los 21 días.

SUSTRATO	CEPA	I	II	III	MEDIA	SUMA
ARROZ	LOCAL	90	95	95	93,33	280,00
ARROZ	C - 24	95	100	95	96,67	290,00
ARROZ	C -13	90	90	95	91,67	275,00
TRIGO	LOCAL	50	50	50	50,00	150,00
TRIGO	C - 24	70	70	75	71,67	215,00
TRIGO	C -13	60	60	55	58,33	175,00
AVENA	LOCAL	35	35	30	33,33	100,00
AVENA	C - 24	60	60	60	60,00	180,00
AVENA	C -13	45	45	50	46,67	140,00

Anexo 11. Peso final del sustrato con *Beauveria bassiana*.

SUSTRAT	CEPA	I	II	III	MEDIA	SUMA
ARROZ	LOCAL	56,05	55,2	54,27	55,17333333	165,52
ARROZ	C - 24	56,78	58,55	55,8	57,04333333	171,13
ARROZ	C -13	54,38	52,94	54,95	54,09	162,27
TRIGO	LOCAL	66,55	68,51	66,28	67,11333333	201,34
TRIGO	C - 24	68,81	66,96	68,3	68,02333333	204,07
TRIGO	C -13	72,35	70,96	68,84	70,71666667	212,15
AVENA	LOCAL	53,82	53,22	54,14	53,72666667	161,18
AVENA	C - 24	54,8	55,25	52,66	54,23666667	162,71
AVENA	C -13	55,68	55,82	54,42	55,30666667	165,92

Anexo 12. Peso de la cepa de *Beauveria bassiana*.

SUSTRATO	CEPA	I	II	III	MEDIA	SUMA
ARROZ	LOCAL	56,05	55,2	54,27	55,17333333	165,52
ARROZ	C - 24	56,78	58,55	55,8	57,04333333	171,13
ARROZ	C -13	54,38	52,94	54,95	54,09	162,27
TRIGO	LOCAL	66,55	68,51	66,28	67,11333333	201,34
TRIGO	C - 24	68,81	66,96	68,3	68,02333333	204,07
TRIGO	C -13	72,35	70,96	68,84	70,71666667	212,15
AVENA	LOCAL	53,82	53,22	54,14	53,72666667	161,18
AVENA	C - 24	54,8	55,25	52,66	54,23666667	162,71
AVENA	C -13	55,68	55,82	54,42	55,30666667	165,92

Anexo 13. Numero de conidias en la disolución N°6.

	CEPA	I	II	III	MEDIA	SUMA	I	II	III	SUMA	MEDIA
ARROZ	LOCAL	260	264	262,67	262,223333	786,67	1,04E+08	1,06E+08	1,05E+08	3,15E+08	1,05E+08
ARROZ	C - 24	292,33	276,33	301,33	289,996667	869,99	1,17E+08	1,11E+08	1,21E+08	3,48E+08	1,16E+08
ARROZ	C -13	155,67	156,33	196,67	169,556667	508,67	6,23E+07	6,25E+07	7,87E+07	2,03E+08	6,78E+07
TRIGO	LOCAL	150,33	161	157,67	156,333333	469	6,01E+07	6,44E+07	6,31E+07	1,88E+08	6,25E+07
TRIGO	C - 24	258,67	261,67	257,33	259,223333	777,67	1,03E+08	1,05E+08	1,03E+08	3,11E+08	1,04E+08
TRIGO	C -13	180,33	200,33	200	193,553333	580,66	7,21E+07	8,01E+07	8,00E+07	2,32E+08	7,74E+07
AVENA	LOCAL	146	142	121,67	136,556667	409,67	5,84E+07	5,68E+07	4,87E+07	1,64E+08	5,46E+07
AVENA	C - 24	215,67	218	257,67	230,446667	691,34	8,63E+07	8,72E+07	1,03E+08	2,77E+08	9,22E+07
AVENA	C -13	168,33	192,67	191,33	184,11	552,33	6,73E+07	7,71E+07	7,65E+07	2,21E+08	7,36E+07

Anexo 14. Costo de producción del sustrato del arroz.

COSTO DE PRODUCCIÓN DEL ARROZ				
Insumos	Unidad	Cantidad	Precio (Bs)	Sub Total (Bs)
Arroz	kg	0,9	6	5,4
Bolsa de polipropileno	pza.	9	0,14	1,26
Barbijo	pza.	1	1	1
Gorro	pza.	1	1	1
Guantes de látex	par	1	1	1
Papel absorbente	pza.	20	0,14	2,8
Alcohol	l	0,2	16	3,2
Lavandina	l	0,25	18	4,5
Detergente	kg	0,25	8	2
Fosforo	pza.	0,4	0,5	0,2
Grampas	pza.	0,1	3,5	0,35
Papel madera	pza.	0,25	1	0,25
Masquin	pza.	0,1	5	0,5
Costo de reactivación				4,47
Sub Total (Bs)				27,93
COSTOS IMPREVISTOS 10%				2,79
TOTAL (9 bolsas)				30,72
TOTAL POR BOLSA				3,41

Anexo 15. Costo de producción del sustrato del trigo.

COSTO DE PRODUCCIÓN DEL TRIGO				
Insumos	Unidad	Cantidad	Precio (Bs)	Sub Total (Bs)
Trigo	kg	0,9	5	4,5
Bolsa de polipropileno	pza.	9	0,14	1,26
Barbijo	pza.	1	1	1
Gorro	pza.	1	1	1
Guantes de látex	par	1	1	1
Papel absorbente	pza.	20	0,14	2,8
Alcohol	l	0,2	16	3,2
Lavandina	l	0,25	18	4,5
Detergente	kg	0,25	8	2
Fosforo	pza.	0,4	0,5	0,2
Grampas	pza.	0,1	3,5	0,35
Papel madera	pza.	0,25	1	0,25
Masquin	pza.	0,1	5	0,5
Costo de reactivación				4,47
Sub Total (Bs)				27,03
COSTOS IMPREVISTOS 10%				2,7
TOTAL (9 bolsas)				29,73
TOTAL POR BOLSA				3,3

Anexo 16. Costo de producción del sustrato de la avena.

COSTO DE PRODUCCIÓN DE LA AVENA				
Insumos	Unidad	Cantidad	Precio (Bs)	Sub Total (Bs)
Avena	kg	0,9	5	4,5
Bolsa de polipropileno	pza.	9	0,14	1,26
Barbijo	pza.	1	1	1
Gorro	pza.	1	1	1
Guantes de látex	par	1	1	1
Papel absorbente	pza.	20	0,14	2,8
Alcohol	l	0,2	16	3,2
Lavandina	l	0,25	18	4,5
Detergente	kg	0,25	8	2
Fosforo	pza.	0,4	0,5	0,2
Grampas	pza.	0,1	3,5	0,35
Papel madera	pza.	0,25	1	0,25
Masquin	pza.	0,1	5	0,5
Costo de reactivación				4,47
Sub Total (Bs)				27,03
COSTOS IMPREVISTOS 10%				2,7
TOTAL (9 bolsas)				29,73
TOTAL POR BOLSA				3,3