



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMIA

Trabajo de Integración
Curricular previo a la obtención
del Grado Académico de
Ingeniero Agrónomo.

Proyecto de Investigación:

“CAPACIDAD ENTOMOPATÓGENA DE CEPAS NATIVAS DE *Beauveria bassiana*
EN PICUDO NEGRO (*Rhynchophorus palmarum*) *IN VITRO*”

Autor:

Jairo David Gaibor Duarte

Director del Proyecto de Investigación:

Ing. Favio Eduardo Herrera Eguez. PhD.

Quevedo – Los Ríos - Ecuador

2023



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Jairo David Gaibor Duarte**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacerse uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f. _____

Jairo David Gaibor Duarte

C.C: 1207003144



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Ing. Favio Herrera Eguez. PhD., Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Jairo David Gaibor Duarte**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “**Capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* en picudo negro (*Rhynchophorus palmarum*) *In Vitro***”, previo a la obtención del Grado Académico de Ingeniero Agrónomo, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Favio Eduardo Herrera Eguez. PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACION

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito Ing. **Favio Herrera Eguez**. PhD., mediante el presente cumpla en presentar a usted, el informe de proyecto de Investigación titulado “**Capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* en picudo negro (*Rhynchophorus palmarum*) In Vitro**”. Presentado por el estudiante **Jairo David Gaibor Duarte**, egresado de la Carrera de Agronomía, que fue revisado bajo mi dirección según resolución del Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, que se ha desarrollado de acuerdo al Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y cumple con el requerimiento de análisis de URKUND el cual avala los niveles de originalidad en un 95% y similitud 5%, del trabajo investigativo. Valido este documento para que el estudiante siga con los trámites pertinentes, de acuerdo como lo establece el Reglamento.

Document Information

Analyzed document	Tesis_Gaibor_Jairo_Urkund.docx (D178086696)
Submitted	11/8/2023 2:49:00 AM
Submitted by	
Submitter email	mvelez@uteq.edu.ec
Similarity	5%
Analysis address	mvelez.uteq@analysis.arkund.com

Ing. Favio Herrera Eguez. PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACION



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
CARRERA DE AGRONOMIA

PROYECTO DE INVESTIGACION

Capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* en picudo negro
(*Rhynchophorus palmarum*) *In Vitro*.

Presentado al Consejo Directivo de la Facultad como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

Ing. Daniel Federico Vera Avilés, PhD.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Cristóbal Puyi Peñaherrera Chang

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Martin Italo Orrala Icaza MSc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2023

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme de la fortaleza, fuerza e inteligencia necesaria para continuar y llevar a cabo mis actividades académicas.

Doy gracias también a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por abrirme las puertas al estudio y darme esta oportunidad de superación.

Agradezco a mi padre y a mi madre quienes me brindaron el apoyo y estuvieron siempre pendiente de cualquier situación en la que necesitara de su ayuda, tuvieron paciencia conmigo y fueron comprensivos en cada situación que se presentaba.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, la Dra. Mayra Vélez Ruiz, por su inestimable guía y apoyo a lo largo de todo el proceso de realización de este proyecto pues su experiencia, dedicación y compromiso fueron fundamentales para el éxito de la investigación. Aprecio profundamente la paciencia con la que me brindó orientación, así como su disposición constante para abordar mis inquietudes y proporcionar valiosas sugerencias. Su acompañamiento no solo enriqueció mi comprensión del tema, sino que también contribuyó significativamente a mi desarrollo académico. Gracias por ser una mentora excepcional y por compartir su conocimiento de manera tan generosa.

Quiero expresarle mi gratitud también a los docentes que a lo largo de mi trayectoria estudiantil me han brindado de sus conocimientos y enseñanzas, de igual forma agradezco a mi tutora de tesis por su profesionalidad y excelencia académica con la cual me ha guiado a lo largo del desarrollo del proyecto.

Agradezco al personal de laboratorio de Biología y Microbiología por sus enseñanzas, de igual manera a los estudiantes de posgrado, los cuales han brindado su guía y conocimientos durante los trabajos realizados.

A los docentes miembros de mi tribunal, por sus observaciones y brindarme su tiempo para realizar un buen trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por darme la fortaleza para continuar en mis labores académicos y permitirme seguir adelante en este proceso formativo.

A mi familia, por brindarme su apoyo incondicional y estar conmigo en cada paso, pese a las adversidades que se han presentado.

A las personas que estuvieron conmigo motivándome durante el proceso, que me dieron ánimos y me brindaron su cálido apoyo diciendo que pronto lo conseguiría.

RESUMEN

Uno de los principales problemas fitosanitarios de la palma aceitera es el picudo negro (*Rhynchophorus palmarum*). La principal forma de control de esta plaga es a través del uso de trampas con atrayentes e insecticidas sintéticos de alta toxicidad. Un enfoque alternativo para el control de *R. palmarum* es el uso de hongos entomopatógenos por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* sobre el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) *in vitro*. El estudio se llevó a cabo en el Campus Experimental "La María" de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, bajo condiciones controladas. Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos, incluyendo cuatro cepas nativas de *B. bassiana*, y dos controles (agua e insecticida). Para llevar a cabo el estudio, los adultos de *R. palmarum* fueron inoculados con una suspensión de 1×10^7 conidios de *B. bassiana*, agua o insecticida (Imidacloprid) en dosis comercial, mediante sumersión. Los insectos se mantuvieron individualmente en recipientes con caña de azúcar durante 48 días y se observó el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio (TL₅₀). Adicionalmente en medio de cultivo PDA se evaluaron las características macro y microscópicas de las cepas. Las cepas LM012; MCB17 MCA1424 y BBAL31 presentaron 91.67%, 100.00%, 91.67% y 53.33% de mortalidad y el TL₅₀ fue de 31, 15, 21 y 36 días respectivamente. Las características macro y microscópicas de las cepas de *B. bassiana* son propias de la especie. Las colonias poseen aspecto algodonoso y polvoriento, hifas sin septos y conidias esféricas. La eficiencia de cepas nativas en el control de *R. palmarum* es evidente, sin embargo, es necesario estudios adicionales en condiciones de campo.

Palabras claves: palma aceitera, hongos entomopatógenos, control, plagas

ABSTRACT

One of the main phytopathological problems of the oil palm is the black weevil (*Rhynchophorus palmarum*). The primary method of controlling this pest is through the use of traps with attractants and high-toxicity synthetic insecticides. An alternative approach to control *R. palmarum* is the use of entomopathogenic fungi. Therefore, the objective of this study was to evaluate the entomopathogenic capacity of native strains of *Beauveria bassiana* on the black weevil of the palm (*Rhynchophorus palmarum*) in vitro. The study was conducted at the Experimental Campus "La María" of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo, under controlled conditions. A completely randomized design was used with six treatments, including four native strains of *B. bassiana*, and two controls (water and insecticide). To carry out the study, *R. palmarum* adults were inoculated with a suspension of 1×10^7 conidia of *B. bassiana*, water, or commercial dose insecticide (Imidacloprid) by immersion. The insects were individually maintained in containers with sugarcane for 48 days, and the percentage of mortality and the mean lethal time (LT_{50}) were observed. Additionally, the macro and microscopic characteristics of the strains were evaluated in PDA culture medium. The strains LM012; MCB17, MCA1424, and BBAL31 showed mortality rates of 91.67%, 100.00%, 91.67%, and 53.33%, and the LT_{50} was 31, 15, 21, and 36 days, respectively. The macro and microscopic characteristics of the *B. bassiana* strains are typical of the species. The colonies have a cottony and powdery appearance, hyphae without septa, and spherical conidia. The efficiency of native strains in controlling *R. palmarum* is evident; however, additional field condition studies are required.

Keywords: oil palm, entomopathogenic fungi, control, pests.

TABLA DE CONTENIDO

Portada	I
Declaración de autoría y cesión de derechos	II
Certificación de culminación del proyecto de investigación.....	III
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico	IV
Certificado de aprobación de tribunal	V
Agradecimientos.....	VI
Dedicatoria	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
Tabla de contenido.....	X
Código dúblin	XV
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1. Problema de la investigación	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2.1. Objetivo general	6
1.2.2. Objetivos específicos	6
1.3. Justificación	7
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
2.1. Marco conceptual	10
2.1.1. Picudo negro <i>Rhynchophorus palmarum</i>	10
2.1.2. Pudrición de cogollo (PC).....	10
2.1.3. Control biológico.....	10
2.1.4. Hongos entomopatógenos.....	11
2.2. Marco referencial.....	11
2.2.1. Origen de la palma africana <i>elaeis guineensis</i>	11
2.2.2. Clasificación taxonómica de la palma africana.....	12
2.2.3. Descripción botánica de la palma africana	12
2.2.4. Importancia de la palma africana.....	13
2.2.5. Producción de palma africana en el Ecuador.....	13

2.2.6. <i>Picudo negro de la palma (R. palmarum)</i>	13
2.2.7. <i>Reseña histórica del uso de beauveria bassiana en el control de Rynchophorus palmarum</i>	16
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	10
3.1. Localización.....	24
3.2. Tipo de investigación	24
3.3. Métodos de investigación	24
3.4. Fuentes de recopilación de la información	25
3.5. Diseño de la investigación.....	25
3.5.1. <i>Factores de estudio</i>	25
3.5.2. <i>Tratamientos</i>	25
3.5.3. <i>Diseño experimental</i>	26
3.6. Instrumentos de investigación	26
3.6.1. <i>Manejo de experimento</i>	26
3.6.2. <i>Variables a evaluar en el experimento</i>	28
3.7. Tratamiento de los datos	30
3.8. Recursos humanos y materiales.....	30
3.8.1. <i>Recursos humanos</i>	30
3.8.2. <i>Recursos materiales</i>	30
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Resultados.....	33
4.1.1. <i>Porcentaje de mortalidad de picudo negro de la palma (R. palmarum)</i>	33
4.1.2. <i>Estimación del tiempo letal medio (TL₅₀) de adultos de picudo negro de la palma (R. palmarum)</i>	34
4.1.3. <i>Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de B. bassiana</i>	35
4.2. Discusión	37
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1. Conclusiones.....	42
5.2. Recomendaciones	43
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	44
6.1. bibliografía	45
CAPÍTULO VII. ANEXOS.....	52
7.1. Anexos	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos utilizados en estudio	26
Tabla 2. Caracterización macroscópica de cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	35
Tabla 3. Caracterización microscópica de cepas de <i>Beauveria bassiana</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de adultos de picudo negro de la palma (*R. palmarum*) tratado con cuatro cepas de *Beauveria bassiana*, agua e insecticida. Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos $P < 0.05$ 33
- Figura 2.** A) Curvas de supervivencia y B) tiempo letal medio (TL_{50}) de adultos de picudo negro de la palma (*R. palmarum*) tratados con cuatro cepas nativas de *Beauveria bassiana*, agua e insecticida. Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos $P < 0.05$ 34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Captura recolección de insectos de picudo negro de la palma	53
Anexo 2. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de <i>Beauveria bassiana</i>	53
Anexo 3. Dilución y conteo de esporas de <i>Beauveria bassiana</i>	54
Anexo 4. Desinfección de picudos negros en hipoclorito de sodio y agua destilada.	54
Anexo 5. Sumersión de insectos en concentración, insecticida y agua destilada	55
Anexo 6. Evaluación de variables de porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio.....	55
Anexo 7. Observación y caracterización macroscópicas de cepas nativas de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	56
Anexo 8. Observación y caracterización microscópicas de cepas nativas de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	56

CÓDIGO DÚBLIN

Título:	Capacidad entomopatógena de cepas nativas de <i>Beauveria bassiana</i> en picudo negro (<i>Rhynchophorus palmarum</i>) <i>in vitro</i> .
Autor:	Jairo David Gaibor Duarte
Palabras clave:	Palma africana, hongos entomopatógenos, control, plagas
Fecha de publicación	
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2023
Resumen:	Uno de los principales problemas fitosanitarios de la palma aceitera es el picudo negro (<i>Rhynchophorus palmarum</i>). La principal forma de control de esta plaga es a través del uso de trampas con atrayentes e insecticidas sintéticos de alta toxicidad. Un enfoque alternativo para el control de <i>R. palmarum</i> es el uso de hongos entomopatógenos por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad entomopatógena de cepas nativas de <i>Beauveria bassiana</i> sobre el picudo negro de la palma (<i>Rhynchophorus palmarum</i>) <i>in vitro</i> . El estudio se llevó a cabo en el campus experimental "La María" de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, bajo condiciones controladas. Se utilizó un diseño completamente al azar (...).
Abstract:	One of the main phytopathological problems of the oil palm is the black weevil (<i>Rhynchophorus palmarum</i>). The primary method of controlling this pest is through the use of traps with attractants and high-toxicity synthetic insecticides. An alternative approach to control <i>R. palmarum</i> is the use of entomopathogenic fungi. Therefore, the objective of this study was to evaluate the entomopathogenic capacity of native strains of <i>Beauveria bassiana</i> on the black weevil of the palm (<i>Rhynchophorus palmarum</i>) <i>in vitro</i> . The study was conducted at the experimental campus "La María" of the Universidad Técnica Estatal de Quevedo, under controlled conditions. A completely randomized design was used (...).
Descripción:	72 hojas; dimensiones 29 x 21 cm + CD ROM 6162
Url	

Introducción

La palma africana (*Elaeis guineensis*) es considerado un cultivo de importancia económica para Ecuador, sin embargo, puede ser afectado por diversos problemas fitosanitarios tales como, el anillo rojo producida por la presencia del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, el cual interfiere en la formación del follaje, rendimiento del fruto y formación del tallo (Hector, 2004), la pudrición del cogollo (PC) (*Phytophthora palmivora*) que afecta en la producción de racimos y termina con la muerte de la planta (Sarria *et al.*, 2008) y la pudrición basal que produce cambios en la coloración del follaje, iniciando en las hojas bajas y ascendiendo gradualmente hasta alcanzar las hojas superiores (Mestizo *et al.*, 2012).

Adicionalmente, encontramos al picudo negro (*Rhynchophorus palmarum*), el cual se alimenta de los tejidos frescos de la palma. Las hembras depositan sus huevos en lugares en donde se han producido cortes o heridas ya sea por labores de cosecha o poda y cuando las larvas emergen se alimentan de los tejidos blandos del cogollo y de las bases peciolares lo que impide que la palma genere nuevos tejidos sanos (Aldana de la Torre *et al.*, 2015).

El principal método de control del picudo negro de la palma es la reducción de población, para lo cual se utilizan diversos métodos de trampeo para atraer y capturar estos insectos (Cuadrado y Vera, 2012), también; están los métodos biológicos en donde se usa hongos entomopatógenos para reducir la población de picudo negro. Uno de los hongos más destacados a utilizar en el control del picudo negro es el hongo *Beauveria bassiana* (Ortega *et al.*, 2006).

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* pertenece a la clase Deuteromycetes, es capaz de infectar a más de 200 especies de insectos (Pavone, 2021), tiene una amplia capacidad patogénica de infestar diversos insectos generando un alto índice de mortalidad, pues es un hongo que puede ser muy virulento cuando se aplica en condiciones óptimas, utilizando las técnicas correctas de mezcla y aplicación (Bernand, 2019). Debido a esta información previa, se reconoce que el hongo *B. bassiana* se destaca como uno de los recursos más eficaces para la gestión biológica de plagas, y su aplicación tiene el potencial de desempeñar un papel fundamental en la regulación de infestaciones que representan un desafío significativo para la industria agrícola.

En contraste con las bacterias y los virus que afectan a los insectos como patógenos, *B. bassiana* ataca al huésped desde el momento en que se produce un contacto físico directo, sin requerir que el insecto lo consuma para que ocurra la infección. Cuando las esporas de este hongo entran en contacto con la cutícula de insectos susceptibles, germinan y crecen directamente a través de la cutícula hasta el cuerpo interno de su huésped (Grodén, 2021). Uno de los compuestos bioactivos producidos por *B. bassiana* es la micotoxina beauvericina que ayuda a interferir con el sistema inmunológico del insecto, lo que facilita la invasión del hongo a todos los tejidos (Pavone, 2021).

Actualmente, existe en el mercado métodos de control de plagas que están en exceso cubierto de formulaciones de pesticidas sintéticos altamente tóxicos. El mal manejo, y el uso intensivo de los insecticidas sintéticos causan problemas en la salud humana, en el agroecosistema e inclusive generan resistencia por parte del insecto. Es por ello que, la implementación de métodos biológicos que presenten baja o nula toxicidad como la utilización de hongos entomopatógenos es considerada una buena alternativa para la reducción poblacional de *R. palmarum*.

Existen diversas cepas de *B. bassiana* tanto nativas como comerciales para el control de *R. palmarum*, sin embargo, el grado de patogenicidad varía entre ellas. El presente estudio busca evaluar la capacidad patogénica de cepas nativas de *B. bassiana* en condiciones in vitro para el control de *R. palmarum*.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

El picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) es una plaga que causa grandes afecciones a varias especies de plantas de la familia Arecaceae, especialmente a la palma africana (*Elaeis guineensis*), llegando a causar la pérdida de grandes extensiones de cultivo por la diseminación del picudo. Los daños que el insecto puede causar son de manera directa e indirecta. El daño directo se ve ocasionado por las larvas que se alimentan de las bases peciolares y en ciertos híbridos interespecíficos llega a dañar la inflorescencia. El daño indirecto se ve reflejado al ser el vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* que es responsable de la enfermedad del anillo rojo, así como la asociación que tiene con la enfermedad conocida como la pudrición del cogollo (*Phytophthora palmivora*).

El control de *R. palmarum*, está basado en el uso de insecticidas químicos altamente tóxicos, ocasionando graves problemas en la salud y el medio ambiente, adicionalmente se ha registrado problemas de resistencia del insecto a estos productos. El uso de hongos entomopatógenos es una alternativa promisorio para el control de *R. palmarum* debido a su potencial como controlador de especies del orden Coleoptera y el bajo impacto en la salud ambiental y humana que posee.

Diagnóstico

El picudo negro (*R. palmarum*), es un insecto plaga reconocido por los daños que puede ocasionar en la plantación de palma africana. Es vector del nemátodo *Bursaphelenchus cocophilus* responsable de causar la enfermedad de anillo rojo presente en los tallos, además, está asociado a la enfermedad de la pudrición del cogollo (PC). La asociación entre el picudo negro y la pudrición del cogollo representa uno de los problemas más serios para los productores de palma. Las hembras del picudo negro depositan sus huevos en el cogollo de plantas infectadas por PC y las larvas lo utilizan como fuente de alimento, dificultando el proceso de recuperación de la planta o causando su muerte.

Pronóstico

El uso de plaguicidas sintéticos altamente tóxicos para el control del picudo negro en el cultivo de palma africana puede generar una serie de problemas que afectan de manera significativa al medio ambiente y al productor. En el caso de no buscar alternativas eficientes y menos tóxicas para el control del picudo negro los problemas que ya existen se van a intensificar. Los problemas de resistencia de los insectos a los plaguicidas van a ser más frecuentes, existiría mayor contaminación del suelo, aire o agua, y esto afectaría a otras especies no objetivo como insectos benéficos, además, se incrementarían los riesgos a la salud humana por la utilización continua de plaguicidas.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* sobre el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) *in vitro*?

1.1.3. Sistematización del problema

¿Cuál es el porcentaje de mortalidad de adultos de *Rhynchophorus palmarum* tratados con cepas nativas de *Beauveria bassiana*?

¿Cuál es el tiempo letal medio (TL₅₀) de adultos de *Rhynchophorus palmarum* tratados con cepas nativas de *Beauveria bassiana*?

¿Cuál es la caracterización macroscópica y microscópica de cepas nativas de *Beauveria bassiana* para el control de *Rhynchophorus palmarum*?

1.2. Objetivos

1.2.1. *Objetivo General*

Evaluar la capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* sobre el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) *in vitro*.

1.2.2. *Objetivos específicos*

- Determinar el porcentaje de mortalidad de *Rhynchophorus palmarum* en estadio adulto en presencia de *Beauveria bassiana*.
- Identificar el tiempo letal medio (TL₅₀) de *Rhynchophorus palmarum* en estadio adulto en presencia de *Beauveria bassiana*.
- Caracterizar macroscópicamente y microscópicamente cepas nativas de *Beauveria bassiana* para el control de *Rhynchophorus palmarum*.

1.3. Justificación

Entre los principales problemas fitosanitarios que se enfrenta el sector palmicultor es la presencia de la enfermedad conocida como Pudrición de Cogollo (PC) producida por el hongo *Phytophthora palmivora*. Los problemas que representa la PC son variados, afecta al área meristemática de la planta, genera una clorosis en el haz de las hojas que puede terminar en lesiones acuosas y con olor fétido, en algunas hojas presenta necrosis en la punta de los folíolos bajos, la enfermedad también suele atacar a las plantas más jóvenes, lo que retrasa el crecimiento de los cultivos y prolonga el tiempo necesario para alcanzar la plena producción, además, esta enfermedad sirve como atrayente para la proliferación del picudo negro *Rhynchophorus palmarum*. Con este problema presente, se dificulta la renovación de palma en áreas afectadas con alta incidencia del picudo debido al daño que continuamente realizan, alimentándose de los tejidos frescos de la planta impidiendo así su desarrollo y generando pérdidas económicas.

En el mercado existen diversos métodos de control para insectos plaga y enfermedades de la palma, pero la mayoría implican altos costos para el productor. Generalmente y debido a la presencia tanto de enfermedades como insectos plaga el uso de plaguicidas sintéticos es el más común. Para el caso del picudo negro, frecuentemente se usan productos insecticidas del grupo de los organofosforados y neonicotinoides reconocidos por su alta toxicidad y efectos negativos sobre otros organismos no objetivo. También es posible utilizar métodos de controles culturales y etológicos a través del uso de trampas con atrayentes alimentares y feromonas lo que permite la captura de insectos adultos.

Adicionalmente, existe la posibilidad de utilizar el método de control biológico para el control de plagas. Los hongos entomopatógenos son un claro ejemplo de controladores biológicos. Los hongos entomopatógenos son organismos que producen enfermedades y causan la muerte de insectos y otros artrópodos. El ciclo vital de estos hongos se divide en una fase parasítica, que va desde la infección hasta la muerte del hospedero y una saprofitica, que transcurre después de la muerte del insecto. Este aspecto de su biología permite a los hongos entomopatógenos actuar como patógenos facultativos, es decir, son capaces de sobrevivir a expensas de la materia orgánica del suelo u otro sustrato, mientras no haya insectos disponibles para infectar.

El empleo de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* para el control del picudo negro han sido estudiado ampliamente. Numerosas cepas han sido cribadas con respecto a su actividad contra los picudos adultos y muchas de ellas producen la mortandad de más del 90%. Los insectos presentan diferente susceptibilidad a las diversas cepas que se comercializan de este hongo. Se han recolectado cepas de diferentes insectos infectados y se han cultivado para crear productos específicos para uso comercial (Quimcasa, 2020).

La utilización del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en el control del picudo negro de la palma (*R. palmarum*) ofrece numerosos beneficios, tanto desde una perspectiva medioambiental como económica, lo que justifica su aplicación como una estrategia efectiva y sostenible para combatir esta devastadora plaga.

Las características patogénicas de *B. bassiana*, su factibilidad de reproducción de manera artificial, su compatibilidad con otros métodos de control, así como la rentabilidad de su uso como una herramienta de control biológico para combatir el picudo negro ofrece una solución segura, efectiva y sostenible que beneficia tanto al medio ambiente como a los agricultores. Al reducir el uso de pesticidas químicos, es posible mejorar las características de los agroecosistemas, y reducir los efectos nocivos en la salud del ser humano. Esta estrategia representa un enfoque prometedor para enfrentar el desafío que representa el picudo negro en la producción de palma africana en el país.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual

2.1.1. Picudo negro *Rhynchophorus palmarum*

Pertenece al orden Coleoptera, familia Dryophthoridae. Se trata de un escarabajo que presenta un color negro mate, su tamaño generalmente va de entre 2 y 5 cm. Cuando alcanza la etapa adulta, este escarabajo exhibe lo que se conoce como dimorfismo sexual, lo que significa que se pueden distinguir claramente el macho y la hembra. La hembra se caracteriza por tener un pico alargado y curvado, que es más largo que el del macho y presenta una superficie lisa (Cartay, 2020).

2.1.2. Pudrición de cogollo (PC)

Es producida por el hongo *Phytophthora palmivora*. Las palmas atacadas con este microorganismo presentan inicialmente una pudrición de la primera flecha a nivel del pecíolo, la misma que se rompe y queda suspendida entre las hojas centrales. Los tejidos basales de estas flechas se encuentran completamente destruidos por una pudrición acuosa, de color blanco amarillento y olor desagradable, convirtiéndose en un foco de proliferación de otra de las plagas más comunes en la palma, el picudo negro *Rhynchophorus palmarum* (Figueroa N. y Chávez M., 1984).

2.1.3. Control biológico

En el contexto del control biológico de plagas, se emplea una estrategia que consiste en la introducción deliberada de depredadores naturales específicos en un área de cultivo para controlar y reducir la población de las especies consideradas como plagas. Esta técnica tiene como objetivo principal erradicar la plaga sin recurrir al uso de productos químicos o pesticidas, lo que conlleva beneficios tanto para la calidad del producto cosechado como para el medio ambiente circundante (Acosta, 2019).

El control biológico se basa en el principio de que los depredadores naturales, como insectos o microorganismos, pueden mantener a raya a las plagas al alimentarse de ellas o parasitarlas. Al introducir estos depredadores en la plantación, se establece un equilibrio natural en el

ecosistema agrícola, lo que a su vez reduce la necesidad de aplicar pesticidas sintéticos, que pueden ser dañinos para la salud humana y el entorno.

2.1.4. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son extremadamente relevantes en el campo del control biológico de insectos plaga, representando el grupo más importante para esta tarea. Prácticamente, todos los insectos susceptibles pueden verse afectados por las enfermedades causadas por estos hongos. El proceso de infección comienza cuando las esporas del hongo entran en contacto con la cutícula (capa externa) del insecto huésped. Una vez en contacto, las esporas germinan y crecen directamente a través de la cutícula hacia el interior del cuerpo del insecto (Perez y Vázquez, 2001). Un aspecto relevante de estos hongos es su capacidad para utilizar la quitina como fuente de carbono, la cual es un componente fundamental del exoesqueleto de los insectos. Además de su acción parasitaria, estos hongos producen diversas toxinas que tienen la capacidad de paralizar o causar la muerte de su huésped insecto. Esto contribuye a su efectividad en el control de plagas de insectos en la agricultura y la silvicultura de manera respetuosa con el medio ambiente (France *et al.*, 2016).

2.2. Marco Referencial

2.2.1. Origen de la palma africana *Elaeis guineensis*

La *Elaeis* proviene del griego de la palma de aceite que significa oliva y *guineensis* por su origen geográfico, es una planta tropical originaria de climas cálidos, a lo largo del Golfo de Guinea, localizados generalmente por debajo de los 500 msnm (Sierra Márquez *et al.*, 2017). Fue introducida a América en el siglo XV junto con los esclavos. Durante el siglo XX se transforma en cultivo comercial. Es una planta propia de la selva húmeda tropical cálida, crece a altitudes por debajo de los 500 msnm, aunque se desarrolla bien en regiones pantanosas (Parra, 2017).

La mayor superficie mundial de cultivo y derivados, se la ubica en Malasia, seguido de Nigeria, Indonesia, Zaire, Costa de Marfil. En el continente americano Colombia y Ecuador poseen importantes parámetros productivos industriales. Las principales zonas de cultivo en

el Ecuador se ubican en Esmeraldas, Quevedo, Santo Domingo y en la región del Oriente Ecuatoriano (Márquez *et al.*, 2016).

2.2.2. Clasificación taxonómica de la palma africana

La clasificación taxonómica está dada de la siguiente manera:

- División: Fanerógamas
- Tipo: Angiosperma
- Clave: Monocotiledóneas
- Orden: Palmales
- Familia: Arecaceae
- Tribu: Coccoinea
- Género: *Elaeis*
- Especie: *guineensis* (Technoserve, 2009).

2.2.3. Descripción botánica de la palma africana

Elaeis guineensis es una palmera monoica, es decir que las flores femeninas y masculinas se producen de manera independiente, pero en la misma planta. Su tronco o tallo tiene unas medidas de 10 a 15 m. de altura y 30 a 60 cm. de diámetro con cicatrices de las hojas viejas. Las hojas presentan características pinnadas de entre 4 y 5 m. de longitud, con 100-150 pares de folíolos de 50-100 cm. de longitud. Se insertan en el raquis en varios planos, dándole a la hoja aspecto plumoso, de color verde en ambas caras (Technoserve, 2009).

El pecíolo de las hojas tiene 1-1.5 m. de longitud con los folíolos de la base convertidos en espinas y con fibras. La inflorescencia es corta pero muy densa, de 10-30 cm. de longitud. Los frutos son de forma ovoide, se generan en racimos con brácteas puntiagudas y presentan una coloración rojiza y de hasta 4 cm. de diámetro (Technoserve, 2009).

2.2.4. Importancia de la palma africana

La importancia está en los derivados de podemos obtener, como por ejemplo el aceite de palma que tiene una amplia gama de usos, que incluyen la fabricación de margarina, grasas de panadería, helados y como aceite de cocina, la adición de aceite a las preparaciones de cereales aumenta en gran medida su densidad calorífica, lo que es particularmente ventajoso para los niños pequeños. El aceite que es obtenido de la fruta se utiliza para fabricar jabones, detergentes, velas, resinas, grasas lubricantes, cosméticos, glicerol y ácidos grasos (Fern, 2022).

2.2.5. Producción de palma africana en el Ecuador

La producción en el Ecuador en los últimos años se ha visto afectada por la demanda del mercado en el extranjero, en el 2022 con el estallido de la guerra entre Ucrania y Rusia se incrementó la demanda del subproducto de la palma, el aceite. Debido a ello, la producción actual de palma está casi en el límite para abastecer la demanda, esto se debe por los efectos de plagas como la pudrición del cogollo, la producción de palma de Ecuador ha caído 222.453 toneladas desde 2017, que fue el año de producción récord con una producción de 604.247 toneladas (Orozco, 2022).

2.2.6. Picudo negro de la palma

Es un habitante natural en donde se cultiva palma aceitera en América trópica, de aquí también deriva su origen, tiene varios nombres comunes entre los cuales se menciona: Picudo, cucarrón de las palmas, gusano de los cogollos, gualpa, entre otros. La palma africana no es el único hospedero de este insecto, pues también se ha visto presente en plantaciones de caña de azúcar, caña brava, guadua, papaya, piña, plátano, banano, mango. Su principal atrayente son los tejidos en descomposición, heridas o cortes presentes en hojas (Albertazzi *et al.*, 2019).

2.2.6.1. Clasificación taxonómica del picudo negro de la palma.

La especie "*Rhynchophorus palmarum*" se encuentra clasificada en el reino "Metazoa", perteneciendo al filo "Arthropoda". Dentro del subfilo "Uniramia", se ubica en la clase "Insecta", lo que la identifica como un insecto. Al adentrarnos en su orden, se enmarca en "Coleoptera", lo que la sitúa en el grupo de los escarabajos. Esta especie específica es parte de la familia "Dryophthoridae", conocida como los gorgojos. Además, se encuentra catalogada en el género "Rhynchophorus", que es un género de escarabajos de gran importancia agrícola y forestal, ya que algunas de sus especies son plagas de palmas y árboles (Alonso y Lyal, 2019).

2.2.6.2. Ciclo de vida del picudo negro de la palma.

- a) **Adultos:** Son picudos de color negro, con el cuerpo en forma de bote. Miden entre 4 y 5 cm de longitud aproximadamente y 1.4 cm de ancho. La cabeza es pequeña y redondeada con un característico y largo rostrum curvado ventralmente. Presentan dimorfismo sexual; los machos tienen un notable penacho de pelos en la parte dorsal hacia el centro del rostrum o pico. Las hembras tienen el rostrum curvo y liso.
- b) **Huevos:** Son de color blanco crema, ovoides y de un tamaño promedio de 2.5 x 1 mm. Son colocados en posición vertical, a una profundidad de 1 a 2 mm y protegidos con un tapón de una sustancia cerosa de color amarillo cremoso. Tienen un periodo de incubación de 2 a 4 días.
- c) **Larvas:** Son ápodas, es decir que no tiene patas. Cuando emergen del huevo pueden medir 3.4 mm de longitud. El cuerpo es ligeramente curvado ventralmente. Su color es blanco cremoso.
- d) **Pupa:** Una vez formado el capullo que protege la pupa inicia la metamorfosis, es decir el cambio de estado de larva a pupa y de pupa a adulto dentro del capullo. El capullo mide aproximadamente 7 a 9 cm de longitud y 3 a 4 cm de diámetro. La pupa es de color café. Cuando es perturbada hace movimientos ondulatorios continuos con el abdomen (Aldana de la Torre *et al.*, 2011).

2.2.6.3. Métodos de control para el picudo negro de la palma.

a) Control químico

Una alternativa de control químico para este insecto es la erradicación directa de palmas enfermas, para esto se utiliza un herbicida sistémico Metanoarsonato monosódico (msma) el cual se inyecta en la estípita de la palma para evitar la colonización del insecto, otros químicos utilizados de forma complementaria para evitar que el insecto ataque a palmas enfermas de pudrición de cogollo es la aplicación de Fipronil, Imidacloprid o Carbaril, que son insecticidas de amplio espectro que atacan al sistema nervioso de los insectos y se pueden aplicar tanto edáfico como foliar, generalmente son aplicados directamente en la zona del cogollo de la palma con una bomba de mochila de 20 litros (Aldana de la Torre. *et al.*, 2013)

b) Control cultural

Después de haber realizado los procesos de cosecha o podas de la palma queda mucho residuo vegetal, ya seas cormos o tallos, que con el tiempo se descompondrán y causaran una fermentación, los picudos son atraídos por estas condiciones de pudrición y humedad, es por ello por lo que es totalmente necesario eliminar estos residuos como una forma de evitar posible foco de diseminación de *R. palmarum* (Quijije *et al.*, 2012).

Si la mata de palma en si presenta una enfermedad como la pudrición del cogollo, es mejor eliminar esta palma ya que también sustituye un atrayente para el picudo, y a su vez representa un foco de propagación que puede afectar a las plantas a su alrededor (Quijije *et al.*, 2012).

c) Control etológico

Una forma de controlar es el uso de métodos de captura masiva, basada en la eliminación continua de adultos a través de trampas con feromonas, sin embargo, hay que tomar en cuenta que por este método no puede eliminar toda la población ya que habrá picudos que seguirán dañando la planta y adultos que evitarán caer en las trampas. Estas trampas deben

ser dispuestas para la que atraiga, capture y evite la huida del picudo, en la cual no será necesario la utilización de algún insecticida pues morirán solos (Armendariz *et al.*, 2014).

d) Control biológico

Los científicos están experimentando con agentes de control biológico, tales como hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) y nematodos (*Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae*) para aumentar la eficiencia de las trampas. Los picudos entran en la trampa a contaminarse para después salir y contaminar a otros (Vézina y Baena, 2020).

e) Control con los hongos entomopatógenos

Durante los últimos años, se ha observado un notable avance en promover la utilización de hongos entomopatógenos para combatir las plagas de insectos. Esta práctica ofrece una serie de ventajas significativas, que incluyen la disminución de los peligros relacionados con la exposición a productos tóxicos para los agricultores, así como la reducción de la cantidad de residuos de insecticidas en los alimentos, lo cual adquiere una gran relevancia, especialmente si se contempla la exportación o ya se está involucrado en ella (Venero, 2021).

2.2.7. Reseña histórica del uso de *Beauveria bassiana* en el control de *Rhynchophorus palmarum*

El picudo negro de la palma *Rhynchophorus palmarum* es una especie ampliamente distribuida en el neotrópico, desde el sureste de California y Texas hasta Bolivia, Perú, Paraguay, Uruguay, Argentina entre otros, pertenece al orden Coleoptera, familia Dryophthoridae, tribu Rhynchophorini.

Es considerada una especie holometábolo por tener metamorfosis completa (Lemus Garza, 2020). Los huevos de *R. palmarum* son de color blanco crema, ovoides y de un tamaño promedio de 2.5 x 1 mm. Tienen un periodo de incubación de 2 a 4 días. Las larvas son ápodas, no tiene patas. Cuando emergen del huevo pueden medir 3.4 mm de longitud. El cuerpo es ligeramente curvado ventralmente. Su color es blanco cremoso. El capullo o pupa mide aproximadamente 7 a 9 cm de longitud y 3 a 4 cm de diámetro. La pupa es de color

café. Cuando es perturbada hace movimientos ondulatorios continuos con el abdomen. Los adultos miden entre 4 y 5 cm de longitud aproximadamente y 1.4 cm de ancho. De cabeza pequeña y redondeada con un característico y largo rostrum curvado ventralmente (Aldana de la Torre *et al.*, 2011).

El picudo negro genera daños tanto de manera directa como indirecta en los cultivos de palma de aceite. El daño directo se origina debido a las larvas, las cuales se alimentan específicamente en las bases peciolares y la región del cogollo de las palmas que han sido afectadas por la pudrición de cogollo. Por otro lado, el daño indirecto se produce porque este insecto actúa como el principal vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, el cual es el causante de la enfermedad conocida como Anillo Rojo (Lemus Garza , 2020).

Los métodos de control empleados para para el control de picudo negro están basados en la captura de adultos utilizando trampas con atrayentes y eliminación de palmas enfermas para evitar proliferación del insecto (Aldana de la Torre *et al.*, 2010).

Para el trampeo se utiliza un recipiente de plástico en el cual se coloca cebo vegetal y feromonas, también se utilizan insecticidas como Fipronil e imidacloprid para la rápida eliminación de los insectos, para evitar la reproducción de *R. palmarum*, se destruye y pica las palmas afectadas y en algunos casos se rocía con glifosato la planta (Aldana de la Torre *et al.*, 2017).

Otro método de control utilizable es el biológico, el cual aprovecha los adversarios naturales de los picudos para mantener bajo control las poblaciones de estos insectos en las áreas de cultivo. Entre los enemigos naturales que pueden emplearse para el control de insectos plaga se incluyen virus, bacterias, nematodos y hongos que son patógenos para los insectos (Enriquez, 2019). Los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* es un claro ejemplo de enemigo natural, posee una amplia potencialidad para el control del picudo negro de la palma y otras especies de insectos plaga (Huanes y Wilson, 2020; Requejo, 2019; Brenes Monge, 2020; Viviani, 2021).

A lo largo de los años ha sido registrado el potencial que tiene *B. bassiana* en el control del picudo negro (*R. palmarum*). A continuación, se registran algunos trabajos relacionados al tema. En la investigación de Gaviria, (2015), realizada con el objetivo de determinar el efecto

de *B. bassiana* (cepa Beauveriplant SBb36) y *Metarhizium anisopliae* (cepa JGVM1) como endófitos en palmas de coco, sobre larvas y adultos de *R. palmarum*. Mediante pulverización foliar con una suspensión de 1×10^8 conidias/mL de *B. bassiana* o *M. anisopliae*, se obtuvieron resultados en los que indican que la colonización por estos hongos, afectan negativamente la oviposición de hembras de *R. palmarum*, así como el daño en los tejidos causados por adultos. De igual manera la cepa Beauveriplant SBb36 afectó significativamente el tamaño de larvas, mientras que, la cepa JGVM1 presentó un efecto intermedio comparado con el control, demostrando que los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* son capaces de colonizar endofíticamente las plantas de coco, afectando negativamente el desarrollo y el daño causado por larvas, así como la oviposición de hembras de *R. palmarum*.

En cuanto a la eficacia que posee *B. bassiana*, el trabajo realizado por los autores; (Sánchez *et al.*, (2017), demostraron que la efectividad de este hongo entomopatógeno sobre instares larvales de *R. palmarum* provocó mortalidades de 33.33 %. Guevara (2018), en su estudio determinó la patogenicidad de *B. bassiana* en adultos vivos de *R. palmarum* L. en condiciones de laboratorio. Entre los resultados obtenidos mostró que todas las concentraciones de conidias de *B. bassiana* utilizadas (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8) ejercieron una actividad entomopatógena (patogénica) hacia *R. palmarum* observando crecimiento micelial y el mayor número de insectos muertos con 2, 7 y 9 individuos a los 5, 10 y 15 días, con un control aproximadamente el 90 % mortalidad de los insectos.

León *et al.*, (2019), con el objetivo de determinar la patogenicidad de cepas promisorias de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre adultos de *R. palmarum*, y evaluar la diseminación de las mejores cepas desde adultos machos del picudo inoculados hacia hembras sin inocular. Los resultados indicaron que la cepa CPMa1104 mostró la mayor eficacia (1×10^4 y 1×10^8 conidias mL⁻¹), seguida de la Mt008 (1×10^8 conidias mL⁻¹), con mortalidades de 78.6 % y 67.9 %, respectivamente. Se observó capacidad de diseminación por contacto de *M. anisopliae* cepas CPMa1104 y Mt008, desde adultos machos inoculados hacia hembras sin inocular. La mortalidad de las hembras alcanzó 100 % cuando los machos fueron inoculados con la cepa CPMa1104 aplicada en polvo. Concluyendo que la diseminación de las cepas CPMa1104 y Mt008 de *M. anisopliae* por machos inoculados hacia hembras sin inocular, lo cual convierte el uso de este entomopatógeno en una alternativa promisoriosa de control.

En otra especie plaga perteneciente al mismo género (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) también se ha probado la eficiencia de *B. bassiana*. Husseini, (2019), probó la eficacia de un aislado local del hongo entomopatógeno *B. bassiana* contra las larvas y adultos del picudo rojo de las palmeras (RPW) *R. ferrugineus* mediante la pulverización directa de las conidiosporas del hongo en las etapas específicas en condiciones de laboratorio, usó seis concentraciones aumentadas sucesivas de 6×10^2 a 6×10^7 esporas/mL. Los resultados revelaron que las tasas máximas de mortalidad para las larvas tratadas del tercer estadio. Cualquiera que fuera la concentración probada, la mortalidad final alcanzó (100%). En el caso de las larvas de L7 tratadas, la tasa de mortalidad osciló entre el 45 y el 75% y los individuos restantes sobrevivieron y formaron capullos en los que todos murieron en la etapa de pupa. Además, todos los adultos tratados murieron, lo que demuestra que las concentraciones más altas probadas de *B. bassiana* mataron en un tiempo más corto (7 días) que en las concentraciones más bajas probadas (11 días).

Ahmed y Freed (2021) verificaron la eficacia de *B. bassiana* contra larvas de *R. ferrugineus* de tercer estadio utilizando las siguientes concentraciones, 3×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 esporas/mL. El valor de LC₅₀ más bajo (1.3×10^7 esporas/mL) se registró en la población de Khyber Pakhtunkhwa (KPK), seguida por las poblaciones de Punjab, Sindh y Baluchistán, que tenían valores de LC₅₀ de 1.5×10^7 , 5.3×10^7 y 1.02×10^8 esporas/mL, respectivamente, al séptimo día post-tratamiento; las tasas de mortalidad más altas fueron 90.0, 85.0, 77.5 y 75.0% para las poblaciones de KPK, Punjab, Sindh y Baluchistán, respectivamente, en la concentración más alta probada de *B. bassiana*.

Dembilio *et al.*, (2018), en condiciones de laboratorio para la especie *R. ferrugineus*, obtuvo un tiempo letal del 50% (TL₅₀) de 4.33 días cuando se expuso a adultos (de 7 a 10 días de edad) al túnel de inoculación (IT) que contenía 1×10^{10} conidias g⁻¹ en una formulación fúngica (*B. bassiana*) a base de aceite. Esta formulación mantuvo la viabilidad de los conidios al 50 % durante hasta 2 meses. Además, cuando los adultos estuvieron expuestos a TI de 2.5 meses de antigüedad, la mortalidad aún alcanzó el 50% 40 días después de la exposición. Los ensayos de semicampo demostraron que el dispositivo permitía el fácil tránsito de los insectos a través del TI, que eran efectivamente atraídos e infectados. Utilizando las IDA en ensayos de campo en parcelas de 4 ha, obtuvo una reducción >50% en el porcentaje de palmas centinela infestadas.

(Alvarado *et al.*, 2013), con el objetivo de encontrar cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, que puedan infectar adultos y larvas de *R. palmarum*. Evaluaron la patogenicidad de 24 cepas de *M. anisopliae* (L.) y *B. bassiana* sobre adultos de *R. palmarum*, posteriormente las cepas que causaron la mayor mortalidad se evaluaron sobre el estado larval. Los resultados indicaron que las cepas de *M. anisopliae* (L.) más patogénicas fueron CPMa1105, CPMa1104 y CPMa1001, las cuales provenían de adultos de *R. palmarum*, causando mortalidades del 87, 83 y 80 % sobre adultos y 27, 36 y 45 % sobre larvas de *R. palmarum*, respectivamente.

López *et al.*, (2022); con el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad quitinolítica y bioactividad de hongos aislados del picudo de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) y muestras de suelo de áreas de cultivo de coco (*Cocos nucifera*) frente al propio insecto. Inicialmente, para determinar las propiedades quitinolíticas de los hongos aislados, evaluó su capacidad para hidrolizar la quitina en medio de cultivo líquido, realizaron pruebas preliminares de patogenicidad, utilizando como modelo el picudo del frijol (*Acanthoscelides obtectus*), para seleccionar los aislados de hongos que se utilizarían en experimentos con el picudo de la palma. Finalmente, evaluó la bioactividad de dos hongos entomopatógenos seleccionados sobre larvas y adultos del picudo de la palma. No hubo correlación directa entre la actividad quitinolítica y la patogenicidad en el picudo del frijol ni entre los aislamientos y la bioactividad en el picudo de la palma. *Beauveria bassiana* CSU9 muestra la mayor actividad sobre larvas y adultos del picudo de las palmeras, con un tiempo letal promedio de 0.8 y 14.4 días, respectivamente.

Alencar *et al.*, (2020), con el objetivo de evaluar el efecto de hongos entomopatógenos en adultos de *R. palmarum*. Para la concentración 10^8 conidios. mL^{-1} , los aislados CPATC 032 y CPATC 057 causaron una mortalidad confirmada del 52 y 44% de los adultos de *R. palmarum*, respectivamente. A la concentración de 10^9 conidios. mL^{-1} , los aislados CPATC 032 y CPATC 057 causaron mortalidad de 64 y 52% de los insectos, respectivamente. Para el aislado CPATC 032, en las tres concentraciones analizadas, los insectos tuvieron una supervivencia promedio de 11 a 12 días. El TL_{50} del aislado CPATC 032 en concentraciones de 10^8 y 10^9 conidios. mL^{-1} fue de aproximadamente 17 días. Todos los aislados analizados y el producto Boveril® son patógenos para *R. palmarum*.

De igual manera López, (2020), en palma de coco (*Cocos nucifera* L.) encontró que dos aislamientos, *B. bassiana* CSU9 y *Trichoderma virens* CSC11, presentaron actividad insecticida frente a *A. obtectus* con tiempos letales medios (TL₅₀) de 5 y 4 días, respectivamente. Las pruebas de infección sobre larvas y adultos de *R. palmarum* mostraron alta efectividad de *B. bassiana* CSU9 alcanzando TL₅₀ de 0.76 a los 14.37 días respectivamente. Estos resultados demuestran el potencial que tienen los hongos entomopatógenos nativos para controlar *R. palmarum*, representando un recurso viable para el desarrollo de productos que puedan ser articulados a programas de manejo integrado de plagas.

En cuanto a la caracterización de cepas de *Beauveria bassiana* este hongo presenta un crecimiento lento, circular, llegando a alcanzar 2 cm de diámetro en 10 días, valores aproximados fueron obtenidos por Domsch *et al.*, (1980) para la colonia de *B. bassiana* en un rango de 0.6 a 2.3 cm de diámetro. El aspecto de la colonia es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana.

Esta especie de hongo (*B. bassiana*) posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fialides se encuentran hinchadas en la base que asemeja la estructura de un frasco sub-globoso y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag. El tamaño de las células conidiógenas es de 3.8-7 x 1.3-1.8 µm, el raquis de 2.2-4.2 x 1 µm. Los conidios de *B. bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2-3 µm de diámetro, estos resultados coincidieron con la descripción hecha por Alean (2003) y Domsch y Anderson, (1993), para la especie *B. bassiana*.

El trabajo realizado por Yareta, (1997); encontró tres rangos de tamaño y dos tipos de forma de las conidias: <= 2.5 µm (redondos), 2.6-3.5 µm (redondos) y 4.0-5.0 x 2.5-3.0 µm (subglobosos). Tienen conidias elipsoidales, que difieren de las conidias redondas típicas de esta especie. Estos mismos aislamientos fueron los únicos que tuvieron una cantidad abundante de blastoconidios. El tamaño de las conidias varió entre 2.5 - 5.0 µm, Algunos aislamientos tuvieron una alta proporción de conidios de 2.5 µm y otros de 3.75 µm de diámetro. Sólo dos aislamientos mostraron una proporción baja de conidios de 5.0 µm de diámetro.

Elósegui *et al.*, (2006), reportó las características macroculturales de *B. bassiana* encontradas en *Metamasius hemipterus*, en PDA presentó colonias al inicio blancas afieltradas que con el tiempo se tornan cremas polvorientas. Reverso amarillo ligero, y las características microculturales mostraron células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2.0-3.0 (2.3 μm) x 2.0-2.5 (2.1 μm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1.0-2.5 (1.9 μm) x 1.0-2.0 (1.7 μm). las encontradas en *Spodoptera frugiperda*, mostraron características diferentes en PDA colonias algodonosas y blancas al inicio que se tornan beige y ligeramente polvorientas con el tiempo y reverso miel, con células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas, 2.0-3.0 (2.4 μm) x 2.0-2.5 (2.3 μm). Conidios muy homogéneos, hialinos, globosos, algunos ligeramente subglobosos, 2.0-2.0 μm .

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

El siguiente estudio fue realizado en el laboratorio de Biología y Microbiología del Campus Universitario “La María” de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el Km. 7,5 Vía Quevedo – El Empalme. Sus coordenadas geográficas son 1° 04' 49.2 " S, 79° 30' 05.3" W y altitud de 67 m.

3.2. Tipo de investigación

El tipo de investigación fue de tipo experimental con el objetivo de evaluar la capacidad entomopatógena de cepas nativas de *Beauveria bassiana* sobre el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) en condiciones *in vitro*.

3.3. Métodos de investigación

En el desarrollo de la investigación, se implementaron diversos métodos de investigación que permitieron abordar de manera sistemática y estructurada la evaluación de la capacidad entomopatógena de *Beauveria bassiana* en el picudo negro de la palma. El método inductivo fue considerado para la recolección de datos específicos al verificar la interacción entre las cepas de *Beauveria bassiana* y el picudo negro de la palma, en donde se obtuvieron datos de la mortalidad y de tiempo letal medio (TL₅₀). Por otro lado, el método deductivo se empleó con el objetivo de establecer un razonamiento lógico a partir de premisas claramente definidas, al reconocer la eficacia de *Beauveria bassiana* y su capacidad infecciosa en una amplia variedad de insectos y que entre ellos se encuentra *Rhynchophorus palmarum*. Adicionalmente se utilizó el método analítico, el cual estuvo vinculado estrechamente con el análisis de los datos obtenidos durante la investigación, especialmente en lo que respecta a la evaluación de las variables establecidas para alcanzar los objetivos planteados. Este enfoque analítico permitió la concordancia de resultados, proporcionando así una base sólida para las conclusiones derivadas del estudio. En conjunto, la combinación de estos métodos proporcionó una perspectiva integral y rigurosa que respaldó el proceso de investigación.

3.4. Fuentes de recopilación de la información

La recopilación de información para la investigación se realizó mediante el uso de fuentes primarias y secundarias. En el caso de las fuentes primarias, se realizó la evaluación directa de variables mediante observaciones minuciosas, obteniendo información fiable y verídica en cada uno de los experimentos realizados, además estuvo basada en los registros personales derivados de observaciones previas de datos procedentes del entorno en el laboratorio. Por otro lado, entre las fuentes secundarias utilizadas se incluye revistas especializadas, plataformas web de confianza, libros, artículos científicos, guías técnicas y otros recursos bibliográficos relevantes. Este enfoque comprensivo facilitó una revisión exhaustiva de la literatura existente y permitió la evaluación de aspectos específicos relacionados con la investigación que permitieron el respaldo de esta investigación.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Factores de estudio

Se evaluaron cuatro cepas nativas del hongo *Beauveria bassiana* sobre el picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) en condiciones *in vitro*, además, se utilizaron dos tratamientos control un control positivo (insecticida) y un control negativo (agua) para realizar evaluar la mortalidad de los insectos y el tiempo letal medio (TL₅₀).

Para la caracterización macroscópica y microscópica solo se utilizaron las cuatro cepas nativas para realizar las observaciones.

3.5.2. Tratamientos

Para evaluar las variables de porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio (TL₅₀) de picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) se utilizaron los siguientes tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1*Tratamientos utilizados en estudio*

	Tratamientos	Descripción/Nombre de cepas
T1	Cepa 1 <i>Beauveria bassiana</i> 1 x 10 ⁷ conidios/mL	LM012
T2	Cepa 2 <i>Beauveria bassiana</i> 1 x 10 ⁷ conidios/mL	MCB17
T3	Cepa 3 <i>Beauveria bassiana</i> 1 x 10 ⁷ conidios/mL	MCA1424
T4	Cepa 4 <i>Beauveria bassiana</i> 1 x 10 ⁷ conidios/mL	BBAL31
T5	Aplicación de Agua	Control negativo
T6	Aplicación de Insecticida	Control positivo

Elaborado: Autor

3.5.3. Diseño experimental

Para el presente estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para las variables mortalidad y tiempo letal medio (TL₅₀) donde se evaluaron un total de seis tratamientos y catorce repeticiones. Además, se realizó un análisis descriptivo para dar cumplimiento al tercer objetivo planteado en la investigación. Para la evaluación de las variables porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio (TL₅₀) de picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) fue establecida a partir de la aplicación de los estimadores de Kaplan-Meier y la comparación de los tratamientos utilizando el test de Holm-Sidak (P<0.05).

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo de experimento

a) Elaboración de trampas para la captura de picudo negro

Se realizaron trampas siguiendo la metodología propuesta por Moya Murillo *et al.*, (2015), a partir de recipientes plásticos de 20 L de capacidad, y en el que realizó cortes rectangulares de 8 cm de ancho por 12 cm de longitud en los laterales, se cubrió el recipiente desde la base hasta la altura de los cortes con una lona sintética para facilitar el ingreso de los insectos hacia la trampa. Dentro del recipiente se colocó el cebo alimentar

(melaza + piña) y en el centro del recipiente se ubicó la feromona (Rhyncholure). Estas trampas fueron distribuidas de manera aleatoria en una plantación de la palma africana.

b) Colecta de especímenes de picudo negro

Después de dos días de la instalación de las trampas en la plantación de palma africana se procedió a revisar y recolectar los insectos de picudo negro en cada trampa, la frecuencia de colecta fue cada dos días. Este procedimiento se realizó hasta coleccionar la cantidad necesaria de individuos para realizar los experimentos establecidos (84 especímenes). Los insectos colectados fueron colocados en recipientes plásticos de 500 mL con 25 g de caña de azúcar picada en pequeñas piezas para su alimentación y en donde permanecieron un periodo de cuarentena.

3.6.1.1. Experimento 1.- Ensayo de mortalidad y tiempo letal medio (TL_{50}) de picudo negro de la palma *Rhynchophorus palmarum*.

a) Desinfección de insectos adultos de picudo negro de la palma

Una vez cumplido el periodo de cuarentena adultos de *Rhynchophorus palmarum* pasaron por un proceso de desinfección. Para realizar la desinfección de los picudos fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (concentración de 0,5%) por un periodo de tiempo de treinta segundos, posteriormente, los insectos recibieron tres enjuagues de agua destilada. Para eliminar el exceso de humedad los insectos fueron colocados en papel toalla.

b) Aplicación de los tratamientos

Para realizar la aplicación de las cepas se *B. bassiana* se utilizó la metodología de Alvarado (2013), los adultos de *R. palmarum* se sumergieron en una suspensión del hongo con la concentración de 1×10^7 conidias/mL, durante un minuto. Los insectos fueron colocados dentro de recipientes de 500m L, con 25 g de caña de azúcar. Para el tratamiento con agua, los insectos fueron sumergidos en agua destilada estéril, mientras que, para el tratamiento con insecticida se utilizó el producto Imidacloprid (Desnukador) (1 cc/L agua).

c) Verificación de la mortalidad de especímenes de picudo negro de la palma

Se contabilizó diariamente la mortalidad de insectos por la exposición de las cepas de cada tratamiento. Se realizó este procedimiento durante un periodo de 48 días. Los insectos muertos fueron retirados de los recipientes y ubicados en cámaras húmedas. Las cámaras húmedas consistieron en placas Petri de 9 cm, forradas en el fondo con gasa humedecida en agua destilada estéril, los insectos fueron dispuestos sobre la gasa. Cada cámara húmeda fue colocada dentro de una incubadora (Thermo Fisher Sci 60L Ovn Grvty) para registrar y confirmar la esporulación del hongo.

3.6.1.2. Experimento 2. - Caracterización de cepas de *B. bassiana*.

a) Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *B. bassiana*

Para la caracterización microscópica se utilizó aislados del hongo *Beauveria bassiana* (Cepa 1= LM012, Cepa 2= MCB17, Cepa 3= MCA1424, Cepa 4= BBAL31) de 15 días de crecimiento en medio de agar PDA a 26°C. Con ayuda de un bisturí, se recolectó una pequeña porción de la colonia y se la colocó en tubos eppendorf con 900 µm de agua destilada y 100 µm del tinte azul de metileno, la muestra se la agitó en un vortex por dos minutos, con una pipeta se extrajo 10µm y se colocó en un portaobjeto para la observación en un microscopio a 40x. Fueron observadas y fotografiadas conidias y micelio de cada una de las cepas para compararlas entre sí. Las esporas fueron medidas utilizando el programa ImageJ y comparadas entre cada una de las cepas. Diez esporas por cada cepa fueron consideradas para el estudio.

3.6.2. Variables a evaluar en el experimento

3.6.2.1. Porcentaje de mortalidad de adultos de picudo negro de la palma *Rhynchophorus palmarum*.

El número de adultos de *R. palmarum* muertos que fueron expuestos a los diferentes tratamientos utilizados en la investigación fueron contabilizados y transformados a porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$\% M = \frac{\# \text{ Im} \times 100}{\# \text{ Ti}}$$

Donde:

- % M: Porcentaje de mortalidad.
- # Im: Número de insectos muertos por acción de los tratamientos.
- # Ti: Número total de insectos utilizados en el ensayo.
- 100: Constante

3.6.2.2. Evaluación del tiempo letal medio (TL₅₀) del picudo negro de la palma *Rhynchophorus palmarum*.

En conformidad con los datos de mortalidad en el que se verificó el número de insectos vivos y muertos, se estimó el tiempo letal medio (TL₅₀) para cada tratamiento en un periodo de 48 días de exposición. Diariamente se revisaba el estado de los insectos adultos y se anotaba el día de evaluación, el estado en el que se encontraba (vivo o muerto) y el tratamiento al que pertenecía. Se utilizaron 14 insectos adultos de *R. palmarum* para estimar el TL₅₀.

3.6.2.3. Evaluación de características macroscópicas y microscópicas de cepas de *B. bassiana*.

Para la caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *B. bassiana* se realizó la siembra de cada cepa tomando micelio aéreo de cada una de las cepas utilizadas y colocando en una caja Petri que contenga el medio de cultivo de PDA (39 g/L) + Rifampicina y Sulfato de Estreptomicina. Las cajas Petri con el medio de cultivo y la cepa sembrada fueron incubadas por 7 días a una temperatura de 26 °C. El proceso fue replicado dos veces por cada cepa y mantenido por 15 días hasta observar que en la superficie del medio de cultivo aparezca suficiente micelio del hongo. Se revisó semanalmente el desarrollo y morfología del hongo.

Las características morfológicas de color y aspecto de las cepas de *B. bassiana* se hizo mediante la observación directa, una vez que se alcanzó el máximo desarrollo de los hongos, se comparó su morfología con las características descritas por (Padilla *et al.*,

(2000) y García *et al.*, (2020). Los 7 días iniciales sirvieron para conocer el crecimiento en cuanto a su color, la forma del borde y pigmentación que se genera en el medio. En la segunda semana se visualizó el color de su esporulación.

3.7. Tratamiento de los datos

La variable de mortalidad de adultos de picudo negro fue analizada utilizando el modelo lineal generalizado GLM (Familia: Poisson) y para realizar la comparación de las medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Las curvas de supervivencia y el tiempo letal medio fue establecido a partir de la aplicación de los estimadores de Kaplan-Meier y la comparación de los tratamientos utilizando el test de Holm-Sidak ($P < 0.05$). Para la caracterización de las cepas de *B. bassiana* se realizó un análisis descriptivo. Se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad para cada variable mediante las pruebas de Bartlett y Shapiro-Wilk, respectivamente, pero no se requirió ninguna transformación de datos. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat (versión universitaria), SigmaPlot (Versión 12.0) y RStudio (Versión 4.2.2).

3.8. Recursos humanos y materiales

3.8.1. Recursos Humanos

- Docente director del Proyecto de Investigación.
- Responsable del Laboratorio de Biología y Microbiología
- Estudiante responsable de la investigación.

3.8.2. Recursos Materiales

3.8.2.1. Materiales.

- Balanza
- Calculadora
- Cámara

- Thermoblock
- Cámara de flujo laminar
- Trampas de feromonas
- Placas Petri
- Incubadora
- Parafilm
- Papel toalla
- Matraz
- Erlenmeyer
- Pipetas
- Autoclave

3.8.2.2. *Reactivos.*

- Agua destilada
- Alcohol
- Cloro
- Insecticida

3.8.2.3. *Materiales de oficina.*

- Laptop
- Hojas de papel bond de 75 g
- Lapiceros
- Libreta
- Agenda

3.8.2.4. *Materiales del experimento.*

- Cepas de *Beauveria bassiana*
- Picudo negro (*Rhynchophorus palmarum*)

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Porcentaje de mortalidad de picudo negro de la palma *R. palmarum*

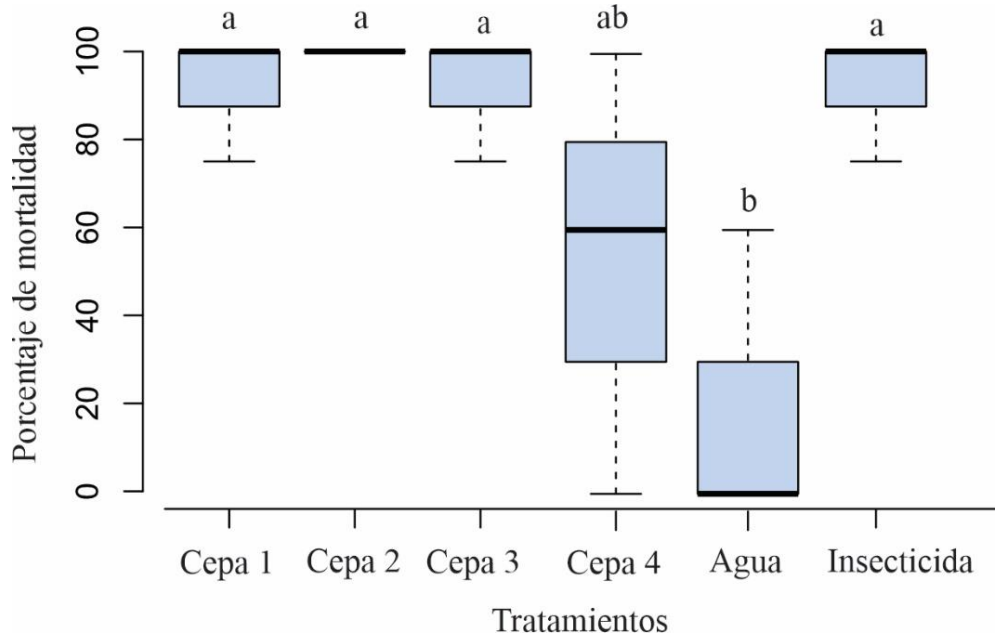
Considerando el análisis de realizado, fue posible evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2=10.83$; $DF=5$; $P=0.05$). (Figura 1). Las cepas 1, 2, 3 y el tratamiento insecticida, se comportaron de forma similar, permitiendo un porcentaje de mortalidad de adultos de picudo negro de la palma superior al 90%.

De acuerdo con lo observado la cepa 4, resultó menos patógena para el picudo negro de la palma, mientras que, para el tratamiento en el que los insectos adultos fueron tratados con agua se obtuvo el porcentaje más bajo de mortalidad.

El porcentaje medio para cada uno de los tratamientos evaluados fueron los siguientes: cepa 1= 91.67%, cepa 2= 100.00%, cepa 3= 91.67%, cepa 4= 53.33%, agua= 20.00% e insecticida= 91.67%.

Figura 1

Porcentaje de mortalidad de adultos de picudo negro de la palma (*R. palmarum*) tratado con cuatro cepas de *Beauveria bassiana*, agua e insecticida. Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos $P<0.05$.



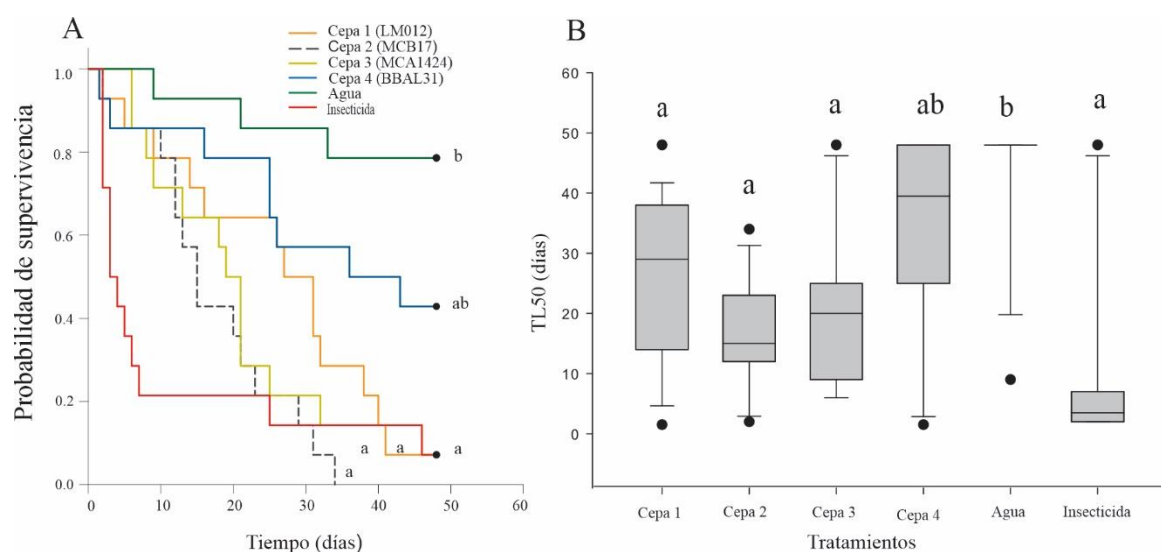
Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Prueba de Tukey).

4.1.2. Estimación del tiempo letal medio (TL_{50}) de adultos de picudo negro de la palma *R. palmarum*

Las curvas de probabilidad de supervivencia de adultos de *Rhynchophorus palmarum* expuestos a cuatro cepas de *B. bassiana*, agua e insecticida son mostradas en la Figura 2a. Debido a la estrecha relación que tiene con el análisis de porcentaje de mortalidad fue posible verificar el comportamiento de la mortalidad de los insectos utilizando el análisis de supervivencia (test Long Rank Test) el cual confirmó que existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados ($X^2= 37.71$; $DF = 5$; $P < 0.001$).

Figura 2

A) Curvas de supervivencia y B) tiempo letal medio (TL_{50}) de adultos de picudo negro de la palma (*R. palmarum*) tratados con cuatro cepas nativas de *Beauveria bassiana*, agua e insecticida. Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos $P < 0.05$.



Nota: Letras iguales no indican diferencias significativas entre los tratamientos $P < 0.05$

El tiempo letal medio (TL_{50}) fue medido durante 48 días, en el cual se verificó el tiempo de la mortalidad del 50% de los adultos de *R. palmarum* para cada tratamiento. Fue posible evidenciar el TL_{50} para las cepas 1,2,3, y 4 el cual fue de 31, 15, 21 y 36 días respectivamente, mientras que; para el tratamiento con insecticida fue de 3 días. Para el tratamiento con agua no fue posible obtener el dato debido a que no alcanzaron la mortalidad requerida para el análisis (Figura 2B).

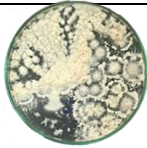



4.1.3. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *B. bassiana*

a) Caracterización morfológica macroscópica

Las cepas de *B. bassiana* se caracterizaron por presentar un crecimiento lento, circular inicial y posteriormente forman varias colonias. El crecimiento del hongo varió entre cada una de las cepas evaluadas, sin embargo, el aspecto de las colonias observadas de todas las cepas es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios. Su color va desde blanco en los primeros días (del día 1 al día 8) hasta amarillento/beige a los 15 días, su textura es blanda y posee superficie plana o irregular. Las características morfológicas macroscópicas de cada cepa son mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2

Caracterización macroscópica de cepas de Beauveria bassiana

Cepa nativa de <i>Beauveria bassiana</i>	Ubicación	Aspecto de la colonia	Crecimiento de colonia	Color	Superficie de la colonia
LM012 	La Maná/ Cotopaxi	Polvorienta	Irregular	Blanco	Semi elevada
MCB17 	Mocache/ Los Ríos	Polvorienta	Circular	Beige	Elevada
MCA1424 	Machala/ El Oro	Algoodonosa	Circular	Beige	Elevada
BBAL31 	Babahoyo/ Los Ríos	Polvorienta	Irregular	Blanco	Elevada



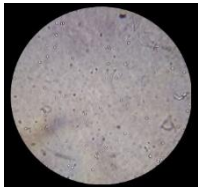


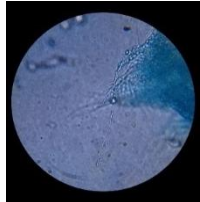

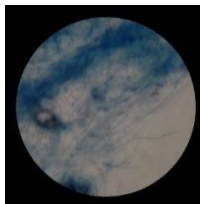
Nota: El crecimiento del hongo varió entre las diferentes cepas, pero las características que presento fueron las propias del género

b) Caracterización morfológica microscópica

Fueron caracterizadas cuatro cepas de *B. bassiana* utilizando un microscopio. En la siguiente caracterización se observaron las esporas y micelio de cada cepa evaluada. Las estructuras observadas fueron comparadas entre sí de acuerdo con la literatura citada por García *et al.*, (2011). Adicionalmente, se pudo contrastar la presencia de hifas alargadas sin septos conformando ligeras ramificaciones dando paso a los conidióforos intercalados en las observaciones microscópicas. En la tabla 3, se observa las imágenes de conidias con sus respectivas medidas y el micelio de cada cepa evaluada.

Tabla 3

Caracterización microscópica de cepas de Beauveria bassiana

	Cepa nativa de <i>Beauveria bassiana</i>	Conidias	Área media μm^2	Longitud media μm	Micelio
Cepa 1	LM012		1.84 μm^2	2.82 μm	
Cepa 2	MCB17		2.40 μm^2	3.08 μm	
Cepa 3	MCA1424		1.65 μm^2	2.81 μm	
Cepa 4	BBAL31		2.14 μm^2	2.90 μm	

Nota: Visualmente no se observaron diferencias entre las cepas, las hifas eran alargadas sin septos con ligeras ramificaciones.

4.2. Discusión

Las especies de hongos entomopatógenos son las más examinadas y empleadas en el control biológico de insectos, y su potencial uso como bioinsecticidas se reconoce en diversas familias de coleópteros (Kreutz *et al.*, 2010; Velazquez *et al.*, 2005; Gindin *et al.*, 2006; Tinzaara *et al.*, 2007; Pedrini *et al.*, 2010). El hongo *Beauveria bassiana*, es conocido por ser un agente entomopatógeno de varias especies de insectos plaga, entre ellas el picudo negro de la palma *Rhynchophorus palmarum* (Costa *et al.*, 2011; Alvarado *et al.*, 2013).

El hongo *B. bassiana* entra en contacto con su huésped, generalmente a través de las conidias (estructuras de reproducción asexual). Las conidias tienen una estructura especializada que les permite adherirse a la cutícula del insecto (Goettel y Inglis, 1997). Una vez adheridas, las conidias germinan y el micelio del hongo crece a través de la cutícula del insecto. El micelio del hongo, al crecer en el interior del insecto, produce enzimas y estructuras especializadas que permiten la penetración de la cutícula. Estas estructuras pueden incluir apresorios y haustorios, que facilitan la invasión de las células del insecto (Roberts y St leger, 2004).

Debido al modo de acción que posee *B. bassiana* resulta altamente eficiente en el control de insectos, sin embargo, su eficiencia depende de varios factores como la temperatura y la humedad ambiental son críticas para la actividad y la supervivencia de este hongo. Las condiciones óptimas varían según la cepa y la especie del hongo (Meyling y Eilenberg, 2007). La susceptibilidad a la infección por *B. bassiana* varía según la especie de insecto. Algunas especies son más resistentes que otras (Lacey *et al.*, 2015).

La cantidad de conidias de *B. bassiana* aplicada y la forma de aplicación son factores críticos para el éxito del control biológico (Vega *et al.*, 2009). La presencia de otros agentes de control biológico, como parasitoides, depredadores u otros hongos entomopatógenos, puede influir en la eficacia de *B. bassiana* (Alkhaibari *et al.*, 2016). Algunas poblaciones de insectos pueden desarrollar resistencia a *B. bassiana* con el tiempo, lo que disminuye su eficacia como agente de control (Lecuona y Tarocco, 2007). En el presente estudio, al analizar la mortalidad del picudo negro de la palma (*R. palmarum*), se observó una similitud en el comportamiento entre las cepas 1, 2, 3 y el

tratamiento con insecticida, lo cual constituye un hallazgo significativo. Este resultado sugiere que estas cepas y el insecticida pueden ser igualmente efectivos para controlar el picudo negro de la palma, logrando un porcentaje de mortalidad superior al 90%. Esto respalda la posibilidad de integrar estas cepas específicas dentro en estrategias de control. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Guevara (2018), en el cual determinó la patogenicidad de *B. bassiana* en adultos vivos de *R. palmarum* L. en condiciones de laboratorio. Los resultados que obtuvo mostraron que todas las concentraciones de conidias de *B. bassiana* utilizadas (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8) ejercieron una actividad entomopatógena observando crecimiento micelial y el mayor número de insectos muertos con 2, 7 y 9 individuos a los 5, 10 y 15 días, con un control aproximadamente el 90 % mortalidad de los insectos.

León *et al.*, (2019), también determinó la patogenicidad de cepas promisorias de *B. bassiana* sobre adultos de *R. palmarum*, encontrando que la cepa CPMa1104 mostró la mayor eficacia (1×10^4 y 1×10^8 conidias mL^{-1}) con mortalidad de 78.6 %.

El uso de cepas nativas a diferencia de las cepas comerciales las cepas nativas pueden estar mejor adaptadas a las condiciones locales y al conjunto de huéspedes específicos de una región (Goettel *et al.*, 2008). En algunos casos, se seleccionan cepas comerciales de *Beauveria bassiana* específicas para su eficacia y capacidad de producción en masa (Lacey y Shapiro, 2008). Es importante evaluar la pureza de las cepas antes de su uso en el campo para evitar la contaminación con otros microorganismos (Lord y Howard, 2005). Por este motivo es importante el uso de cepas nativas que permitan el control de insectos propios de cada localidad. En este estudio fue evidente que las cepas nativas utilizadas cumplen un papel importante en el control del picudo negro, al menos en condiciones controladas.

Alencar *et al.*, (2020) con el objetivo de evaluar el efecto de hongos entomopatógenos en adultos de *R. palmarum* encontrando que el TL_{50} del aislado CPATC 032 correspondiente al hongo *B. bassiana* en concentraciones de 10^8 y 10^9 conidios mL^{-1} fue de aproximadamente 17 días. Todos los aislados analizados y el producto Boveril® son patógenos para *R. palmarum*. De igual manera López, (2020) en palma de coco (*Cocos nucifera* L.) encontró que dos aislamientos, *B. bassiana* CSU9 y *Trichoderma virens* CSC11, las pruebas de infección sobre larvas y adultos de *R. palmarum* mostraron alta

efectividad de *B. bassiana* CSU9 alcanzando LT_{50} de 0.76 a los 14.37 días respectivamente. Estos resultados demuestran el potencial que tienen los hongos entomopatógenos nativos para controlar *R. palmarum*, representando un recurso viable para el desarrollo de productos que puedan ser articulados a programas de manejo integrado de plagas. En el presente estudio fue posible evidenciar que el TL_{50} varió entre 15 y 36 días entre las cepas evaluadas, sin embargo, a diferencia de lo obtenido por Alcazar *et al.*, (2020) la concentración utilizada en este estudio fue menor (10^7 conidios mL^{-1}). Probablemente la concentración, la diversidad genética así como el origen de las cepas de *B. bassiana* está relacionado con estos resultados obtenidos.

En cuanto a la morfología macroscópica, las cepas de *B. bassiana* presentan un crecimiento lento y forman colonias iniciales circulares que luego se diversifican. La apariencia lanosa y en forma de polvo debido a los abundantes conidios es típica de la especie (Roy *et al.*, 2006). El aspecto de la colonia es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana (Elósegui *et al.*, 2006). De forma general, las cepas evaluadas de *B. bassiana* comparten características entre ellas, pero existen algunas variaciones especialmente al crecimiento del micelio en el medio de cultivo. Posiblemente las diferencias encontradas se deben a la diversidad genética que mantiene esta especie. La transición de blanco a amarillento/beige en el color de las colonias a lo largo del tiempo es un fenómeno común en el ciclo de vida de hongos como *B. bassiana*. Este cambio de color puede estar relacionado con la producción y maduración de conidios (Vega *et al.*, 2009).

La especie *B. bassiana* posee hifas alargadas sin septos, formando ligeras ramificaciones y dando paso a conidióforos, esta es una característica típica de este hongo entomopatógeno (Vega *et al.*, 2009). El apresorio que posee es importante para determinar la capacidad del hongo de colonizar y penetrar a los insectos huéspedes. Según Flores, (2003), la forma esférica y el tamaño de las conidias es propia de la especie *B. bassiana*, así como las características de las células conidiógenas, estos criterios morfológicos más utilizados para la clasificación de esta especie.

En este estudio fue posible observar la forma del micelio y conidias de cada una de las cepas, las cuales comparten características similares entre si, tal como lo mencionan Elósegui *et al.*, (2006), quienes reportaron algunas de las características microculturales,

en donde fueron identificadas las células conidiógenas muy típicas de la especie, con bases globosas. 2.0-3.0 (2.3 μm) x 2.0-2.5 (2.1 μm). Conidios hialinos, globosos a subglobosos 1.0-2.5 (1.9 μm) x 1.0-2.0 (1.7 μm).

El reconocimiento de estas estructuras microscópicas observadas es fundamental para comprender el proceso de diseminación de hongos entomopatógenos en especies como *R. palmarum*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El uso de cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* es eficiente para el control del picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum*), sin embargo, el grado de patogenicidad varía entre ellas. De igual forma se observaron los más altos porcentajes de mortalidad entre 91.67%, y 100.00% respectivamente.
- El tiempo necesario para causar la mortalidad del 50% de los individuos (TL₅₀) fue diferente para cada cepa evaluada, demorando entre 15 a 36 días respectivamente, mientras que, para el tratamiento con insecticida fue de 3 días.
- Las cuatro cepas nativas de *B. bassiana* evaluadas en este estudio mostraron características morfológicas macroscópica y microscópica propias del género.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar las cepas de *B. bassiana*: LM012; MCB17 y MCA1424 en concentración de 1×10^7 conidios/mL para el control de *R. palmarum*.
- Aumentar la concentración de las cuatro cepas de *B. bassiana* evaluadas en este estudio para 1×10^9 conidios/mL para verificar la posibilidad de reducir el tiempo letal medio en adultos de *R. palmarum*.
- Realizar evaluaciones de diferentes cepas de *B. bassiana* para el control de *R. palmarum* en condiciones de campo y demostrar su eficiencia.
- Realizar mediciones macroscópicas y microscópicas adicionales a las cepas de *B. bassiana* considerando diámetro de la colonia sembrada, tamaño del micelio, extensión de las hifas presencia de células conidiógenas.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Acosta, M. B. (2019). *Control Biológico de Plagas: Qué es, Ventajas, Desventajas y Ejemplos*. *ecologiaverde.com*. <https://www.ecologiaverde.com/control-biologico-de-plagas-que-es-ventajas-desventajas-y-ejemplos-2226.html>
- Ahmed, R., y Freed, S. (2021). Virulence of *Beauveria bassiana* Balsamo to red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00422-5>
- Aldana de la Torre., R. C., Aldana De La Torre., J. A., Gomes de O., H., y Moya M., O. M. (2013). *Guía de bolsillo para el manejo de Rhynchophorus palmarum*. <https://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/107657>
- Aldana de la Torre, R. C. A. de la, Aldana de la Torre, J. A. A. de la, y Moya, O. M. (2010). Biología, hábitos y manejo de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Boletines técnicos*, 23, Article 23.
- Alean Carreño, I. (2003). *Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca Aleurotrachelus socialis Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero*. Tesis (Microbióloga Agrícola y Veterinaria) [Tesis, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria]. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/66159>
- Alencar, H. M. A., Rodrigues, V. de M., Sabino, A. R., Santos, M. Q. C. dos, Lima, I. S. de, Duarte, A. G., Junior, A. S. N., y Silva, J. M. da. (2020). Effect of isolates of entomopathogenic fungi in the coconut eye borer. *Comunicata Scientiae*, 11, e3300-e3300. <https://doi.org/10.14295/cs.v11i10.3300>
- Alkhaibari, M., Voss, C., y Scholz, B. (2016). Interactions between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the ectoparasitic wasp *Dinocampus coccinellae* on the ladybird *Coleomegilla maculata*. *Insects*, 7(1), 8.
- Alonso, M. A., y Lyal, C. H. (2019). Electronic Catalogue of Weevil names (Curculionoidea) in the Catalogue of Life. 2019. <https://agris.fao.org/search/en/providers/123417/records/6474613c79cbb2c2c1ac8261>

- Alvarado Moreno, H., Montes-Bazurto, L., Oliveira, H., Bustillo, A., y Mesa Fuquen, E. (2013). Patogenicidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* (L.) y *Beauveria bassiana* sobre *Rhynchophorus palmarum** Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (L.) and *Beauveria bassiana* on *Rhynchophorus palmarum*. *Palmas*, 34(2), 11-20.
- Bernand, R. (2019). *Anatis Bioprotection—Biological Solutions* [Anatisbioprotection.]. Anatis Bioprotection. <https://anatisbioprotection.com/en/>
- Brenes Monge, H. (2020). Evaluación in vitro de la capacidad patogénica de aislamientos nativos del hongo *Beauveria bassiana* como agentes de control biológico hacia el insecto *Zabrotes subfasciatus*. *Universidad Nacional de Puerto Rico*. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/19626>
- Cartay, R. (2020, febrero 20). ▷ *Rhynchophorus palmarum*—¿Plaga, Super-alimento o medicina? Del Amazonas. <https://delamazonas.com/fauna/insectos/rhynchophorus-palmarum/>
- Costa Miguens, F., Magalhães, J. A. S. de, Melo de Amorim, L., Rossi Goebel, V., Le Coustour, N., Lummerzheim, M., Inácio Lacerda Moura, J., y Motta Costa, R. (2011). Mass Trapping and Biological Control of *Rhynchophorus palmarum* L.: A hypothesis based on morphological evidences. *EntomoBrasilis*, 4(2), 49-55.
- Dembilio, Ó., Moya, P., Vacas, S., Ortega, L., Quesada, E., A Jaques, J., y Navarro, V. (2018). *Development of an attract-and-infect system to control Rhynchophorus ferrugineus with the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana—Dembilio—2018—Pest Management Science—Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.4888>
- Domsch, K. H., Gams, W., y Anderson, T. H. (1980). Compendium of soil fungi. Volume 1. *Compendium of Soil Fungi. Volume 1*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19811962574>
- Elósegui, O., Jiménez, J., y Carr, Aidanet. (2006). *Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga*. 10(4), 265-272.
- Enriquez, J. (2019). *Control Biológico de los Picudos del Agave y Cocotero*. <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Control-Biologico-de-los-Picudos-del-Agave-y-Cocotero/136>
- Fern, K. (2022). *Elaeis guineensis—Useful Tropical Plants*. <https://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Elaeis+guineensis>

- Figuroa N, M. 43690, y Chávez M, F. 46472. (1984). *Pudrición del cogollo de la palma africana y su control*. <https://repositorio.fedepalma.org/handle/123456789/74493>
- Flores, M. E. V. (2003). Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1419>
- France I., A., Cisternas A., E., y Urtubia H., I. (2016). *Hongos anatomopatológicos. Microorganismos benéficos para el control de A.nodipennis*. 34. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/4639>
- García, C., García-Guajardo, M., Guadalupe, Meza-García, L., y Chávez-Medina, J. (2020). Macromorfología y crecimiento radial de cepas de hongos entomopatógenos suplementado con polvo de lepidópteros. *Revista Colombiana de Entomología*, 46, e10164. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.10164>
- García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., y Martínez, R. F. M. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte sanitario*, 10(2), 21-28.
- Gaviria Vega, J. (2015). *Efecto de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae como endófitos sobre larvas y adultos de Rhynchophorus palmarum L. (Coleoptera: Dryophthoridae) en plantas de coco*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/58999>
- Gindin, G., Levski, S., Glazer, I., y Soroker, V. (2006). Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 34, 370-379. <https://doi.org/10.1007/BF02981024>
- Goettel, G., y Inglis, D. (1997). *Manual of Techniques in Insect Pathology—1st Edition*. <https://shop.elsevier.com/books/manual-of-techniques-in-insect-pathology/lacey/978-0-12-432555-5>
- Goettel, S., Koike, H., Kim, J., Aiuchi, D., y Shinya, R. (2008). Intraspecific variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the melon fly *Bactrocera cucurbitae*, and prospects for isolating virulent native strains. *Biological Control*, 46(2), 142-150.
- Groden, E. (2021, agosto 24). Using *Beauveria Bassiana* for Insect Management | Integrated Pest Management. *Using Beauveria Bassiana for Insect Management*. <https://ipm.cahnr.uconn.edu/using-beauveria-bassiana-for-insect-management/>

- Guevara Loor, D. G. (2018). *Determinación de la patogenicidad de Beauveria bassiana sobre la Gualpa (Rhynchophorus palmarum L.), en condiciones de laboratorio*. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3315>
- Huanes, J., y Wilson, J. (2020). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. En condiciones de laboratorio. *Universidad Nacional de Trujillo*, 36(1).
- Husseini, M. M. (2019). Efficacy of the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0155-3>
- Kreutz, J., Zimmermann, G., y Vaupel, O. (2010). Horizontal Transmission of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the Laboratory and under Field Conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14(8), 837-848. <https://doi.org/10.1080/788222844>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., y Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lacey, L., y Shapiro-Ilan, D. (2008). Microbial Control of Insect Pests in Temperate Orchard Systems: Potential for Incorporation into IPM*. *Annual review of entomology*, 53, 121-144. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093419>
- Lecuona, R., y Tarocco, F. (2007). Laboratory selection of a *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain resistant to benomyl. *Environmental Entomology*, 1(36), 102-107.
- Lemus Garza, E. (2020). *Principales plagas de la palma de aceite en Guatemala – Grepalma*. <https://www.grepalma.org/principales-plagas-de-la-palma-de-aceite-en-guatemala/>
- León-Martínez, G. A., Campos-Pinzón, J. C., y Arguelles-Cárdenas, J. H. (2019). Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae)1. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 631-646.
- López-Luján, L., Ramírez-Restrepo, S., Pérez, J., Salazar-Yepes, M., Arbeláez-Agudelo, N., y Granada, D. (2022). Bioactivity of fungi isolated from coconut growing areas

- against *Rhynchophorus palmarum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 57. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2022.v57.02882>
- Lord, C., y Howard, W. (2005). Assessment of parameters of quality control for the production of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2(28), 10-18.
- Meyling, V., y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145-155.
- Moya Murillo, O., Aldana de la Torre, R., y Bustillo, A. (2015). Eficacia de trampas para capturar *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae) en plantaciones de palma de aceite. *Revista colombiana de entomología*, 41, 18-23.
- Orozco, M. (2022, mayo 20). ¿Qué pasa con el precio del aceite en Ecuador? *Observatorio del Cambio Rural*. <https://ocar.org.ec/2022/05/20/que-pasa-con-el-precio-del-aceite-en-ecuador/>
- Padilla-Melo, G. N., Bernal-Uribe, M. G., Vélez-Arango, P. E., y Montoya-Restrepo, C. (2000). *De aislamientos de Metarhizium anisopliae obtenidos de diferentes ordenes insectiles*.
- Parra. (2017, septiembre 29). La Palma Aceitera Africana Y Su Importantísimo Uso: El Aceite De Cocina. *Agronomaster*. <https://agronomaster.com/palma-aceitera/>
- Pavone, D. (2021). *Una alternativa en el Manejo Integrado de plagas y enfermedades agrícolas* [Artículo de divulgación].
- Pedrini, N., Villaverde, M., Fuse, C., Dal Bello, G., y Juárez, M. (2010). *Beauveria bassiana* Infection Alters Colony Development and Defensive Secretions of the Beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) | *Journal of Economic Entomology* | Oxford Academic. *Entomological Society of America.*, 103(41094-1099). <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/103/4/1094/2199593?redirectedFrom=fulltext>
- Perez, N., y Vázquez, L. (2001). Pérez, N. Y L. L. Vázquez. *Manejo ecológico de plagas*. En: *Transformando el campo cubano. Avances de la Agricultura Sostenible*. Ed. ACTAF. La Habana. Pp. 191-223. 2001 (pp. 191-223).
- Quimcasa. (2020, diciembre 29). *Diciembre 2020*. <https://quimcasa.blog/2020/12/>
- Requejo Sánchez, E. (2019). Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre picudo de la caña (Coleoptera: Curculionidae), bajo condiciones de laboratorio, Chachapoyas - Amazonas [Thesis, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza -

- UNTRM]. En *Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza—UNTRM*.
<https://repositorio.untrm.edu.pe/handle/20.500.14077/1755>
- Roberts, D., y St leger, R. (2004). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Advances in applied microbiology*, 54, 1-70.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54001-7)
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., y Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 331-357.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
- Sánchez-Ríos, O. F., Sánchez-Ríos, L. L., y Gutiérrez-López, K. G. (2017). *Control biológico de larvas de Rhynchophorus palmarum L., 1758 (coleoptera: curculionidae) en condiciones de laboratorio*.
- Sarria, G., Torres, G., Aya, H., Ariza, J., Rodriguez, J., Velez, D., Varon, F., y Martínez, G. (2008). *Phytophthora* sp., es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29, 31-41.
- Sierra Márquez, J., Sierra Márquez, L., y Olivero Verbel, J. (2017). Potencial económico de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). *Agronomía Mesoamericana*, 28(2), 523-534.
- Technoserve. (2009). *Manual tecnico de palma africana—PDF Descargar libre*.
<https://docplayer.es/1149353-Manual-tecnico-de-palma-africana.html>
- Tinzaara, Z., Gold, C. S., Dicke, M., Van Huis, A., Nankinga, C. M., Kagezi, G. H., y Ragama, P. E. (2007). The use of aggregation pheromone to enhance dissemination of *Beauveria bassiana* for the control of the banana weevil in Uganda: Biocontrol Science and Technology: Vol 17, No 2. *Biocontrol Science and Technology*, 17(2), 111-124.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N. K., Monzón, A., Ownley, B. H., Pell, J. K., Rangel, D. E. N., y Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Velazquez, V., Martínez, M., Bosque, L., Najera, M., y Crocker, R. (2005). Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (coleoptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*, 9, 33-36.

- Venero, R. (2021, junio 22). Todo Hongos entomopatógenos para Principiantes. *Bioalternativa*. <https://www.bioalternativaeyf.com/2021/06/hongos-entomopatogenos-para-principiantes/>
- Vézina, A., y Baena, M. (2020). *Trampas de feromonas*. Improving the understanding of banana. <http://www.promusa.org/Trampas+de+feromonas>
- Yareta, A. (1997). Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1), 73-78.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1. Captura y recolección de insectos de picudo negro de la palma.



Anexo 2. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Beauveria bassiana*.



Anexo 3. Dilución y conteo de esporas de *Beauveria bassiana*.



Anexo 4. Desinfección de Picudos negros en hipoclorito de sodio y agua destilada.



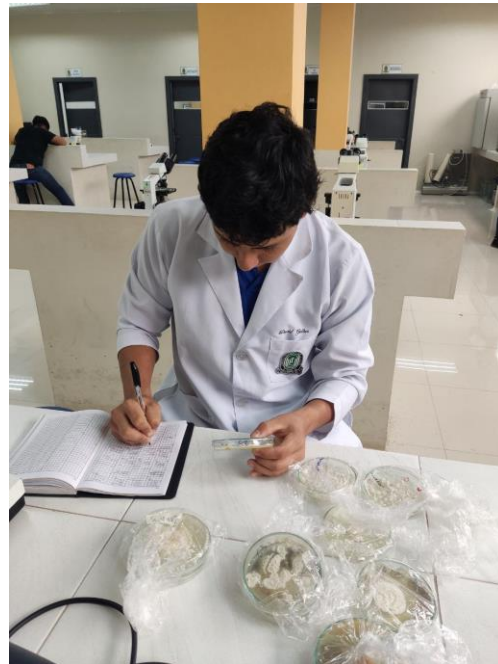
Anexo 5. Sumersión de insectos en concentración de conidias, insecticida y agua destilada.



Anexo 6. Evaluación de variables de porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio.



Anexo 7. Observación y caracterización macroscópicas de cepas nativas de *Beauveria bassiana*.



Anexo 8. Observación y caracterización microscópicas de cepas nativas de *Beauveria bassiana*.

