

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA  
DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS SOBRE GORGOJO DE LOS ANDES  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) BAJO CONDICIONES  
DE LABORATORIO, CHACHAPOYAS, AMAZONAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR : Bach. Daniel, Tineo Flores**

**ASESOR : Mg. Santos Triunfo, Leiva Espinoza**

**CO-ASESOR : Dr. Danilo Edson, Bustamante Mostajo**

**CHACHAPOYAS, PERÚ  
2019**

**“UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA  
DE AMAZONAS”**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE  
INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS  
SOBRE GORGOJO DE LOS ANDES (COLEOPTERA:  
CURCULIONIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO,  
CHACHAPOYAS, AMAZONAS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR : Bach. Daniel, Tineo Flores**  
**ASESOR : Mg. Santos Triunfo, Leiva Espinoza**  
**CO-ASESOR : Dr. Danilo Edson, Bustamante Mostajo**

**CHACHAPOYAS, PERÚ  
2019**

## **DEDICATORIA**

A Dios,  
Por la vida y la salud.

A toda mi familia,  
Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años,

**Daniel Tineo Flores**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por haberme dado la oportunidad de formarme en esta prestigiosa universidad y haber sido mi apoyo durante todo este tiempo.

Al Ing. Santos Triunfo Leiva Espinoza por su apoyo en calidad asesor

Al Dr. Danilo Edson Bustamante Mostajo por su apoyo en calidad de co-asesor durante todo el proyecto de investigación.

A la Dr. Martha Estefany Calderón Ríos por las orientaciones y conocimientos académicos que me proporcionó en la investigación en el desarrollo del proyecto de investigación.

A todas las personas que han formado parte de mi vida personal y profesional quiero darles las gracias por su infinita amabilidad, amistad, apoyo, ánimo y compañía.

Al proyecto “Creación de un servicio de un laboratorio de Entomología y Fitopatología (PROFITEN)” por el apoyo con los equipos para el desarrollo del trabajo de investigación.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO  
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

**Rector.**

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

**Vicerrector Académico.**

Dr. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

**Vicerrectora Investigación.**

Ing. *MSc.* ERICK ALDO AUQUÍNIVÍN SILVA

**Decano (e) de la Facultad  
de Ingeniería y Ciencias Agraria**

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Ing. Santos Triunfo Leiva Espinoza, profesor nombrado de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada: **Actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes (Coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio en Chachapoyas, Amazonas**, del tesista Bach. Tineo Flores, Daniel, egresado de la carrera profesional de Ingeniería Agrónoma de la UNTRM-A.

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la Tesis mencionada sea presentada al Jurado Evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el Acto de sustentación de Tesis.

Chachapoyas, marzo del 2019.

---

*Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza*  
Asesor

## VISTO BUENO DEL CO ASESOR

Dr. Danilo Edson Bustamante Mostajo, Investigador del Instituto de Investigación para Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES - CES), hace constar que ha co-asesorado la tesis titulada: **Actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes (Coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio en Chachapoyas, Amazonas**, del tesista Bach. Tineo Flores, Daniel, egresado de la carrera profesional de Ingeniería Agrónoma de la UNTRM-A.

El investigador del Instituto de Investigación para Desarrollo Sustentable de ceja de selva (INDES - CES), que suscribe da su Visto Bueno para que la Tesis mencionada sea presentada al Jurado Evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el Acto de sustentación de Tesis.

Chachapoyas, marzo del 2019

---

Dr. Danilo Edson Bustamante Mostajo  
Co-Asesor

## **JURADO EVALUADOR DE TESIS**

---

Ing. Guillermo Idrogo Vásquez

**PRESIDENTE**

---

Ing. *Mg. Sc.* Segundo Manuel Oliva Cruz

**SECRETARIO**

---

Ing. *Mg. Sc.* Armstrong Bernard Fernández Jeri

**VOCAL**



# DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General  
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

## ANEXO 2-0

### DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo Daniel Tineo Flores:  
identificado con DNI N° 48502859 Estudiante de la Escuela Profesional de  
Ingeniería Agrónoma  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias  
de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Amazonas.

#### DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:

1. Soy autor de la Tesis titulada: "Actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los árboles (Coleoptero: Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio, Chachapoyas, Amazonas.  
La misma que presento para optar: El Título profesional de Ingeniero Agrónomo.
2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para LA UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 08 de Marzo de 2019

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General  
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

## ANEXO 2-N

### ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 12 de Febrero del año 2019, siendo las 16:00 horas, el aspirante: Daniel Tineo Flores defiende públicamente la Tesis titulada: Actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes (Coleoptera- Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio, Chachapoyas Amazonas para optar el Título Profesional en Ingeniería Agrónoma otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por:  
Presidente: Ing. Guillermo Idrogo Vargas  
Secretario: M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz  
Vocal: Mg. Sc. Armstrong Bernard Fernández Jari

Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente (  )      Aprobado (  )      No apto (  )

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las horas 17:00 del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación del Trabajo de Investigación.

  
PRESIDENTE

  
SECRETARIO

  
VOCAL

OBSERVACIONES: .....

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS .....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR .....	vi
VISTO BUENO DEL CO ASESOR .....	vii
JURADO EVALUADOR DE TESIS .....	viii
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO .....	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN .....	17
II. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo general .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1. Lugar de ejecución .....	20
3.2. Materiales .....	24
3.3. Métodos .....	26
3.3.1. Fase de campo .....	26
3.3.1.1. Captura de gorgojo de los Andes .....	26
3.3.1.2. Colección de muestras para el aislamiento de hongos entomopatógenos .....	26
3.3.2. Fase de laboratorio .....	28
3.3.2.1. Crianza masiva de gorgojo de los Andes .....	28
3.3.2.2. Aislamiento de hongos entomopatógenos a nivel de laboratorio .....	29
3.3.2.3. Cultivo monospórico .....	30
3.3.2.4. Claves taxonómicas para identificación de gorgojo de los Andes ....	31
3.3.2.5. Claves de identificación de hongos entomopatógenos .....	32

3.3.2.6.	Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento de hongos entomopatógenos.....	32
3.3.2.7.	Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento de gorgojo de los Andes	34
3.3.2.8.	Pruebas de patogenicidad con adultos del gorgojo de los Andes .....	36
3.3.2.9.	Preparación de la suspensión de conidios .....	36
3.3.2.10.	Inoculación de la suspensión preparada.....	37
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Diversidad genética de gorgojo de los Andes .....	39
4.1.1.	Observaciones morfológicas .....	39
4.1.2.	Filogenia molecular .....	43
4.2.	Diversidad genética de hongos entomopatógenos .....	45
4.2.1.	Observaciones morfológicas .....	45
4.2.2.	Filogenia molecular .....	47
4.3.	Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes.....	50
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Datos geográficos de aislamiento de hongos entomopatógenos .....	20
<b>Tabla 2.</b> Datos geográficos de colección de gorgojo de los Andes .....	20
<b>Tabla 3.</b> Distribución de tratamientos para el test de patogenicidad de hongos entomopatógenos .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Área geográfica del aislamiento de hongos entomopatógenos .....	21
<b>Figura 2.</b> Área geográfica de colección de gorgojo de los Andes .....	22
<b>Figura 3.</b> Test de patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes .....	23
<b>Figure 4.</b> Crianza masiva de gorgojo de los Andes a nivel de laboratorio. ....	28
<b>Figura 5.</b> Morfología de <i>Premnotrypes</i> sp.....	41
<b>Figura 6.</b> Fases del ciclo de vida del <i>Premnotrypes</i> sp .....	42
<b>Figura 7.</b> Productos de amplificación para gorgojo de los Andes del gen COI. ....	43
<b>Figura 8.</b> Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen COI. ....	44
<b>Figura 9.</b> Estructuras macroscópicas de hongos entomopatógenos.....	45
<b>Figura 10.</b> Estructuras microscópicas de hongos entomopatógenos .....	46
<b>Figura 11.</b> Productos de amplificación de muestras de hongos entomopatógenos para el gen Tef-1.....	47
<b>Figura 12.</b> Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen Tef-1 para especies de <i>Beauveria</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen TEF-1 para especies de <i>Metarhizium</i> .....	49
<b>Figura 14.</b> Nivel de patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium</i> sp, evaluados en dos etapas .....	51
<b>Figura 15.</b> Niveles de patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium</i> sp.....	52
<b>Figura 16.</b> Mortalidad de gorgojo de los Andes respecto al tiempo.....	53
<b>Figura 17.</b> Esporulación de <i>B. bassiana</i> (A) y <i>Metarhizium</i> sp (B). sobre adultos de <i>P. vorax</i> .....	54

## RESUMEN

El uso de hongos entomopatógenos es una herramienta clave para el control biológico del gorgojo de los Andes. La contribución de este método en el programa de manejo integrado de esta plaga es de vital importancia para los productores de papa, ya que les permite incrementar su producción. Por esta razón este proyecto se enfocó en evaluar la actividad biológica de cepas de hongos entomopatógenos (HEP) sobre el “gorgojo de los Andes”. Las colectas del complejo gorgojo de los Andes y las cepas de HEP aislados fueron caracterizadas inicialmente a nivel morfológico y confirmado con un análisis molecular. Luego se realizó un test de patogenicidad mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) con ocho tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos corresponden a 7 cepas de hongos entomopatógenos y aplicación con agua destilada como testigo. Los resultados del análisis morfológico y molecular nos permitió identificar una sola especie del complejo gorgojo de los Andes correspondiente a “*Premnotrypes vorax*” y siete cepas de hongos entomopatógenos: cinco para *Beauveria bassiana* (AS1B, AS4A, AS3C y AS4B) y dos para el género *Metarhizium* sp. (AS5A y AS5B). Para el test de patogenicidad lo mejores tratamientos fueron T6 (AS5A), T7 (AS4B) y T8 (AS5B) con la mayor mortalidad de adultos debido a que las cepas fueron aisladas de cadáveres de insectos silvestres y de larvas de “*P. vorax*”. Los tratamientos T3 (AS3C), T4 (AS4A) y T5 (AS1B) presentaron un nivel de patogenicidad medio y el tratamiento T2 (AS2) fue el que presentó el nivel de patogenicidad más bajo, ya que las cepas fueron aislada de muestras de suelo. Este estudio confirmó el nivel de patogenicidad de las cepas de *Beauveria bassiana* (AS4B), *Metarhizium* sp. (AS5A) y *Metarhizium* sp., (AS5B) para el control de *P. vorax* bajo condiciones de laboratorio, y la eficacia del uso de las técnicas moleculares.

**Palabras claves:** Actividad biológica, hongos entomopatógenos, patogenicidad, gorgojo de los Andes

## ABSTRACT

The use of entomopathogenic fungi is a key tool for the biological control of the Andean weevil. The contribution of this method in the program of integrated management of this pest is of vital importance for potato producers, since it allows them to increase their production. For this reason the project focused on evaluating the biological activity of entomopathogenic fungi strains (HEP) on the Andean potato weevil. The collections of the Andean weevil complex and the isolated HEP strains were initially characterized at a morphological level and confirmed by a molecular analysis. Then a pathogenicity test was carried out using a Completely Randomized Design (DCA) with eight treatments and five repetitions. The treatments correspond to 7 strains of entomopathogenic fungi and application with distilled water as a control. The results of the morphological and molecular analysis allowed us to identify a single species of the Andean weevil complex corresponding to "*Premnotrypes vorax*" and seven strains of entomopathogenic fungi: five for *Beauveria bassiana* (AS1B, AS4A, AS3C and AS4B) and two for the genus *Metarhizium* sp. (AS5A and AS5B). For the pathogenicity test, the best treatments were T6 (AS5A), T7 (AS4B) and T8 (AS5B) with the highest adult mortality because the strains were isolated from the carcasses of wild insects and larvae of "*P. vorax*". The treatments T3 (AS3C), T4 (AS4A) and T5 (AS1B) presented a mean pathogenicity level and treatment T2 (AS2) was the one with the lowest level of pathogenicity, since the strains were isolated from soil samples. This study confirmed the level of pathogenicity of the strains of *Beauveria bassiana* (AS4B), *Metarhizium* sp. (AS5A y AS5B) for the control of *P. vorax* under laboratory conditions, and the efficacy the use of molecular techniques.

Key words: Biological activity, entomopathogenic fungi, pathogenicity, weevil of the Andes



## I. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas de 1997 al 2016, la producción de papa creció rápidamente a una tasa de 3.4% anual llegando a obtener en el 2015 una producción histórica récord de 4,715.9 mil toneladas (Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI], 2017) y para el 2018 la producción de papa registró un crecimiento de 3.7%. Las áreas de sembrío de papa se encuentran en los departamentos de Áncash (79.2%), Puno (73.7%), Tacna (51.2%), Moquegua (33.8%), Apurímac (32.2%), Cajamarca (17.2%), La Libertad (7.2%) y Huánuco (7.1%); en conjunto consolidaron el 61.8% de la producción nacional. Mientras que los departamentos en los que descendió el crecimiento fueron Ica (-53.2%) y Amazonas (-38.9%). (MINAGRI, 2018).

Actualmente, muchos estudios nos han permitido identificar más de un centenar de plagas que afectan a los cultivares de papa; sin embargo, solo algunos generan serios daños a los tubérculos, tal es el caso del complejo gorgojo de los Andes (Panchi *et al.*, 2011). Esta plaga no tiene controladores biológicos eficientes para mantenerlo bajo el umbral de daño económico (Cisneros, 2010) y además no se distribuye uniformemente a lo largo de las montañas andinas, encontrándose focalizado solo en Perú y Bolivia (Alcázar y Cisneros, 1999). Dentro del complejo gorgojo de los Andes, existe 1 especie para el género *Rhigopsidius*, 1 para *Phyrdenus* y 12 para el género *Premnotrypes*. Este último género se encuentra distribuido en Perú con 10 especies siendo todas plagas que afectan los cultivos de papas ubicados comúnmente entre los 2,800 y 4,700 m (Alcázar y Cisneros, 1999).

Los tubérculos dañados por larvas implica una pérdida económica mientras que el daño causado por los adultos implica una pérdida del área foliar que trae como consecuencia una pérdida de rendimiento (García *et al.*, 2006). Cuando las poblaciones son muy abundantes los adultos llegan a comer hasta la nervadura central generando un 63% de daños foliar (Alcázar, 2002). En el caso de *P. suturicallus* puede consumir 68 mm<sup>2</sup> de área foliar en 24 horas, siendo las hembras las que consumen el doble de lo que consume el macho e incluso pueden dañar estolones, tubérculos en formación y la base del tallo de la planta (Alcázar, 2002).

En general el "Gorgojo de los Andes" constituye el principal problema en el cultivo de papa para la zona andina, los daños promedio oscila entre 30 y 50%, llegando en algunos casos a 100% en parcelas de pequeña extensión (Alcázar y Cisneros, 1997). *P. suturicallus* y *P. vorax* son especies que han generado el mayor impacto económico en los cultivos de papa en Perú. La distribución de estas especies se encuentra restringidas geográficamente: *P. vorax* en Cajamarca, *P. suturicallus* en Huancayo, y *P. latithorax* en Cusco (Alcázar, 1997).

Con el fin de disminuir los daños de estos gorgojos, muchas investigaciones se han orientado al estudio de la dinámica poblacional, el uso barreras vegetales y las prácticas culturales para implementar y validar el Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Espitia, 2010; Alarcón *et al.* 2011). La medida más utilizada ha sido el uso de plaguicidas químicos, los cuales no son eficaces, por el contrario incrementan los costos de producción (Espitia, 2010). Además son aplicados sin tener en cuenta un monitoreo adecuado que genere umbrales de afectación económica, y solo se tiene el criterio de proteger la cosecha contra el eventual ataque de la plaga, esta situación ha originado contaminación ambiental, surgimiento de plagas secundarias y efectos nocivos para la salud de agricultores y consumidores (Yanggen *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el empleo de agentes biológicos, como los hongos entomopatógenos han resultado ser los más eficaces (García *et al.*, 2006; Villamil *et al.*, 2014; Villamil *et al.*, 2016). Entre los géneros de estos entomopatógenos más conocidos destacan *Paecilomyces*, *Hirsutela*, *Beauveria* y *Metarhizium* (France *et al.*, 1999).

Bajo este panorama surge la necesidad de buscar alternativas más eficaces y amigables con el medio ambiente para el control de esta plaga, mediante la identificación y uso de hongos entomopatógenos altamente patogénicos, una herramienta que podría servir para diseñar estrategias de manejo y control de estos gorgojos a través del conocimiento del nivel de patogenicidad de estos microorganismos sobre la mortalidad de adultos de gorgojo de los Andes que vienen afectando directamente la productividad de papa en la región Amazonas.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad biológica de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes (Coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar molecularmente las especies de gorgojos de los Andes asociados a los cultivos de papa.
- Caracterizar molecularmente aislamientos de hongos entomopatógenos.
- Determinar el nivel de patogenicidad de los hongos entomopatógenos sobre adultos de gorgojo de los Andes.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en cuatro etapas. La primera fue el aislamiento mediante una georreferenciación y aislamiento de cepas de hongos entomopatógenos nativos como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Datos geográficos de aislamiento de hongos entomopatógenos

Lugar de aislamiento	Altitud (m.s.n.m)	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
Granada	3 027	06° 06' 04.20"	77° 31.69' 0"
Quinjalca	3 130	06° 05' 30.4"	77° 40' 30.4"
Pengote	2 523	06° 32' 58.1"	77° 48' 52.4"
Cueyqueta	2 557	06° 31' 33.0"	77° 48' 50.2"
Jalca Grande M01	2 523	06° 29' 10.7"	77° 48' 54.3"
Jalca Grande M02	2 901	06° 28.82' 0"	77° 48.40' 0"
Jalca Grande M03	2 904	06° 29.43' 0"	77° 48.22' 0"

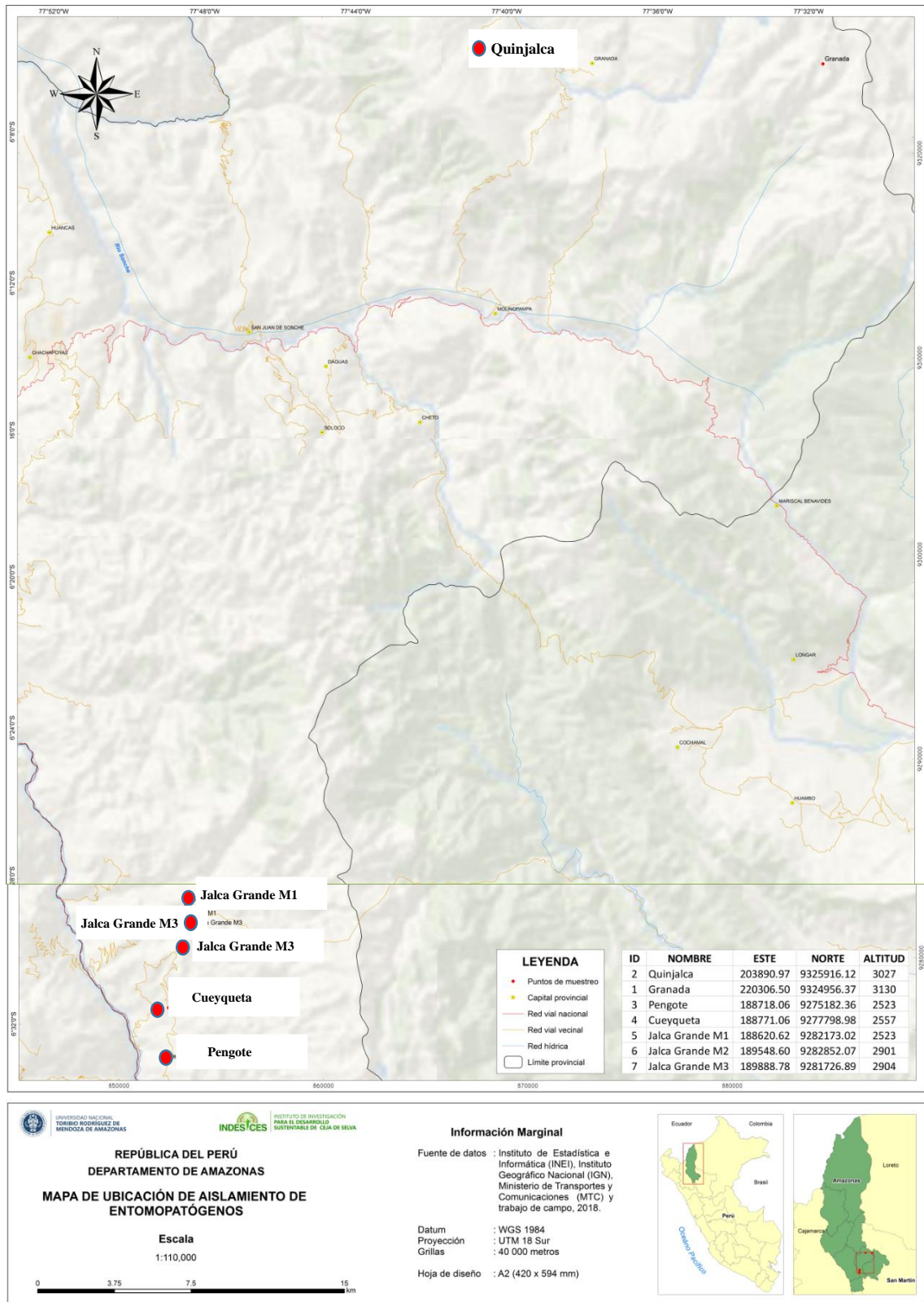
**Fuente:** Elaboración propia, 2019

Asimismo se realizó la identificación, georreferenciación y colección de muestras de complejo gorgojo de los Andes.

**Tabla 2.** Datos geográficos de colección de gorgojo de los Andes

Lugar de colecta	Altitud (m.s.n.m)	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
Pengote	2 523	06° 32' 58.1"	77° 48' 52.4"
Cueyqueta	2 557	06° 31' 33.0"	77° 48' 50.2"
Jalca Grande 01	2 523	06° 29' 10.7"	77° 48' 54.3"
Jalca Grande M02	2 901	06° 28' 81"	77° 48' 40"
Jalca Grande M03	2 904	06° 29' 42"	77° 48' 219"

**Fuente:** Elaboración propia, 2019



**Figura 1.** Área geográfica del aislamiento de hongos entomopatógenos

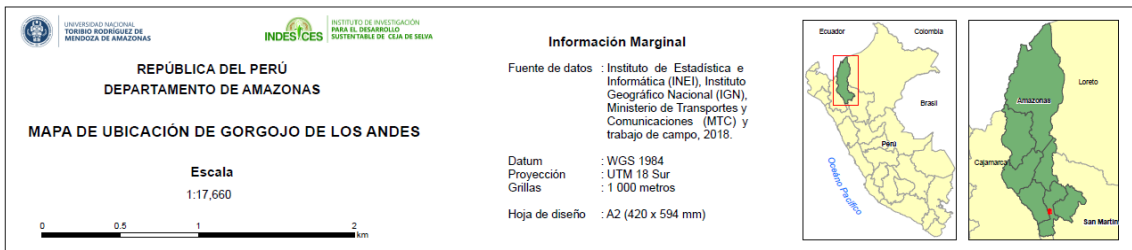
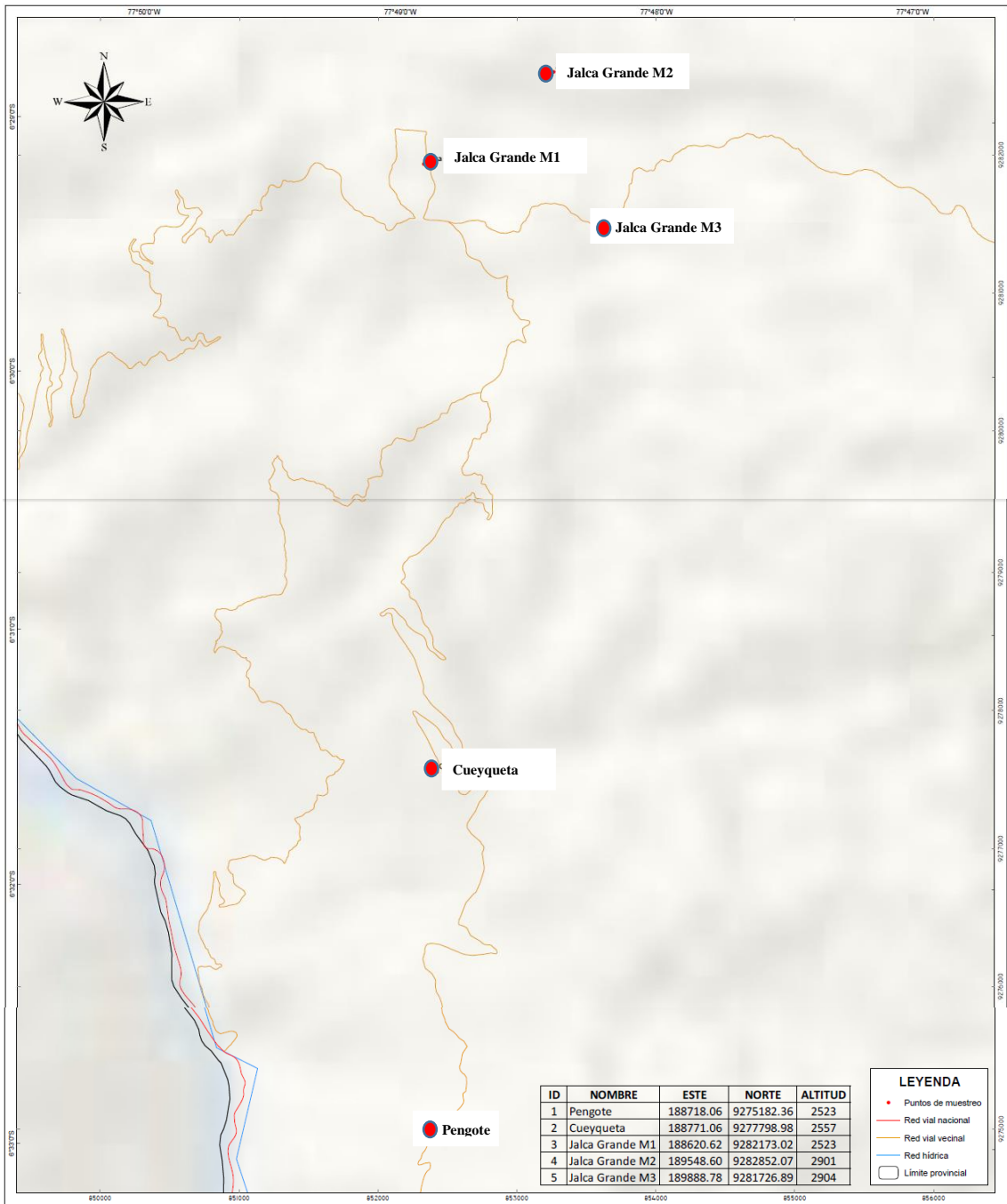
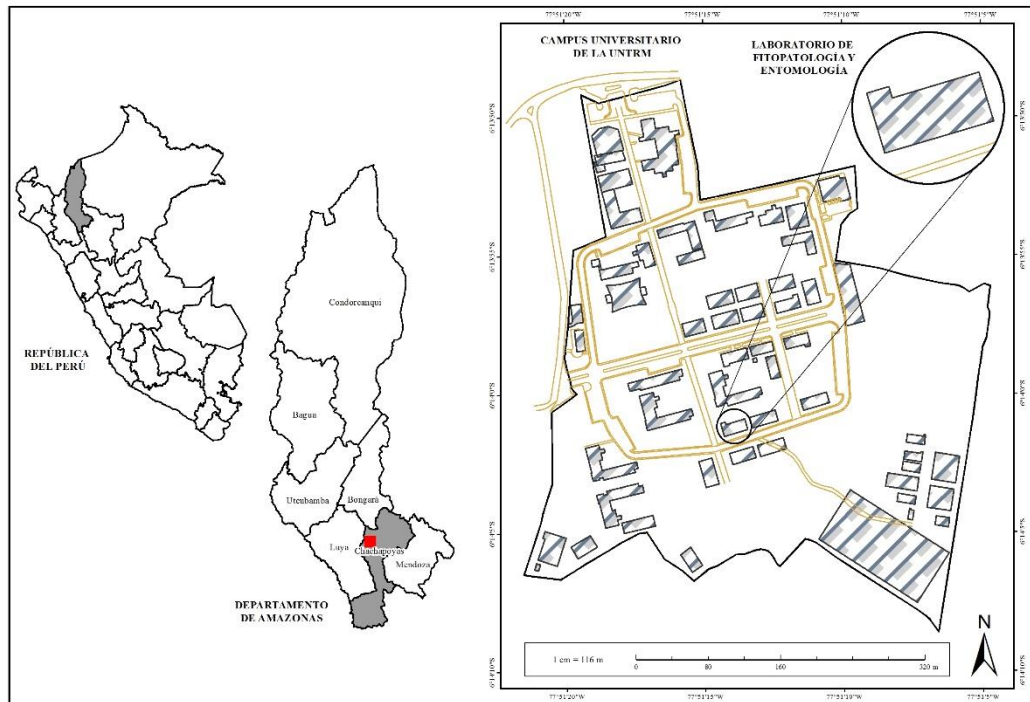


Figura 2. Área geográfica de colección de gorgojo de los Andes

La segunda etapa fue la crianza masiva de G.A y cultivo de HEP. Posteriormente una tercera etapa fue el análisis morfológico y molecular de las cepas de los HEP y del G.A. El proceso que se desarrolló en el laboratorio de Fisiología Molecular de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Y por último, la cuarta etapa fue el desarrollo del test de patogenicidad desarrollado en el laboratorio de Entomología y Fitopatología (Figura 3).



**Figura 3.** Test de patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes

### **3.2.Materiales**

#### **Material biológico**

- Especímenes de gorgojo de los Andes (en estado adulto)
- Cepas de hongos entomopatógenos
- Tubérculos de papa variedad “Única”

#### **Materiales de campo**

- Cuaderno de registros
- Bolígrafo
- Pinzas entomológicas
- Cinta métrica
- Bolsas plásticas
- Cinta adhesiva
- Vasos descartables
- Cuchillo
- Ligas
- Malla tull
- Cámara fotográfica digital

#### **Materiales de oficina**

- Laptop
- Papel bond A-4
- Material bibliográfico

#### **Materiales de laboratorio**

- Pinzas entomológicas
- Láminas porta objetos
- Láminas cubre objetos
- Alfileres entomológicos
- Vasos de precipitado de 20, 50 y 100 mL.
- Placas de Petri.
- Mechero de Bunsen
- Probetas de 20, 100 mL
- Matraces de Erlenmeyer 250 mL
- Tubos de ensayo
- Pissetas



- Pipetas
- Micropipetas de 2, 10, 200 y 1 000 uL
- Tubos eppendorf (de microcentrífuga) de 1.5 mL estériles
- Gradilla para tubos de 1.5 mL
- Guantes descartables
- Bata de laboratorio
- Papel toalla
- Marcadores para etiquetar tubos
- Espátula

### **Insumos y reactivos**

- Alcohol 76° y 96°
- Tween 20
- Medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar)

### **Equipos**

- GPS
- Termohigrómetro
- Incubadora
- Refrigeradora
- Vórtex
- Microscopio
- Cámara de Neubauer
- Microcentrífuga
- Cámara de electroforesis
- Termociclador
- Termobloque
- Fotodocumentador

### **3.3.Métodos**

#### **3.3.1. Fase de campo**

##### **3.3.1.1. Captura de gorgojo de los Andes**

Debido al complejo ciclo biológico de estos gorgojos, y las condiciones agroclimáticas en las zonas de muestreo, el uso de trampas fue ineficiente para la captura, por el cual se adoptó el método de “colección de larvas”. Para este método se realizó visitas a los campos de cosecha de los productores de papa; se colectó tubérculos de papa infestados con larvas. Las muestras fueron recolectadas de los sectores de Péngote ubicados a 2,523 m.s.n.m, Cueyqueta a 2,557 m.s.n.m, La Jalca a 2,523 m.s.n.m, y el anexo el Toche a 2,904 m.s.n.m pertenecientes al distrito de La Jalca Grande (Figura 2). Cada muestra fue acondicionada en bandejas plásticas y transportadas al laboratorio de Entomología y Fitopatología de la UNTRM para su crianza masiva.

##### **3.3.1.2. Colección de muestras para el aislamiento de hongos entomopatógenos a nivel de campo.**

Para el aislamiento de hongos, las muestras se colectan en el hábitat natural del gorgojo de los Andes (Cañedo y Ames, 2004), tal es así que las muestras fueron colectadas de áreas cercanas a los cultivos de papa de los distritos de La Jalca Grande, Quinjalca y Granada de la provincia de Chachapoyas, zonas donde prospera este cultivo que se encuentran en altitudes que sobrepasan los 3,000 m.s.n.m (Figura. 3). Asimismo, se utilizó diferentes tipos de muestras que se colectaron en temporada de lluvias, durante los meses de marzo-abril.

##### **Muestras de suelo**

Basándose en la metodología de Hernández-Velázquez *et al.* (2011), con algunas modificaciones para el aislamiento de hongos a partir del cultivos de papa, se tomó aproximadamente 1 kg de suelo de los primeros 15 cm de profundidad en áreas perimétricas de los cultivares. Aclarando que no se tomó muestras dentro de las parcelas debido al

uso excesivo de fungicidas que usan los productores para el control enfermedades, lo cual afectaría nuestros resultados. Las muestras fueron colocadas y selladas en bolsas de polietileno para ser transportadas al laboratorio de fitopatología y entomología de la UNTRM y realizar el proceso de aislamiento específico.

### **De cadáveres de insectos silvestres**

Cañedo y Ames (2004), mencionan que se deben coleccionar insectos que presenten signos iniciales o avanzados de estar infectados por hongos. Siendo así, en este trabajo se coleccionaron insectos muertos localizados fuera de los cultivos de papa. Con una pinza entomológica fueron aislados y colocados dentro de recipientes plásticos debidamente cerrados y etiquetados que fueron transportados al laboratorio de fitopatología y entomología de la UNTRM.

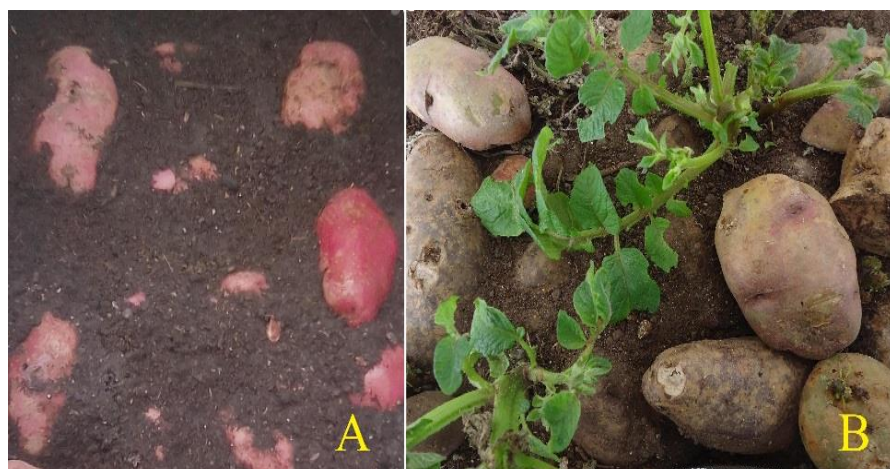
### **Trampas para microorganismos**

Para esta técnica de aislamiento se aplicó la metodología descrita por Campo-Martínez *et al.* (2014), con algunas modificaciones hechas en este proyecto. En este caso se utilizó 40 g de arroz por cada vaso desechable de 100 mL de volumen. El arroz fue cocido y sin sal durante 15 minutos. Cada vaso fue cubierto con una malla tipo tulle, ajustados con una liga. Las trampas fueron colocadas de forma invertida bajo el suelo entre los primeros 10 cm de profundidad y distribuidas en los perímetros de las parcelas de papa. Para evitar la entrada de agua de lluvia se cubrió con una pequeña capa del mismo suelo y cartón. Después de 10 días las trampas fueron retiradas y transportadas al laboratorio de fitopatología y entomología de la UNTRM para el aislamiento de hongos entomopatógenos.

### 3.3.2. Fase de laboratorio

#### 3.3.2.1. Crianza masiva de gorgojo de los Andes

Se aplicó la metodología hecha por Pérez *et al.* (2009), para *Premnotrypes vorax*, pero con algunas modificaciones para una crianza a partir de larvas de gorgojo de los Andes. Los tubérculos infestados con larvas fueron acondicionados en bandejas plásticas de 24 cm de ancho por 40 cm de largo, en su interior contenían sustrato húmedo y esterilizado (tierra más turba) de 10 cm de espesor. Cada bandeja estuvo cubierta con malla tipo tull y sujetados con una banda elástica. Cuando las larvas completaron su ciclo larva-adulto, estos fueron transferidos a otras bandejas con sustrato esterilizado y plantas de papa para su alimentación. La Figura 4 muestra el acondicionamiento de tubérculos infestados con larvas y por cuestiones de escasez de alimento para los adultos de gorgojo de los Andes, estos también fueron alimentados con tubérculos de papa (Figura. 4B).



**Figura 4.** Crianza masiva de gorgojo de los Andes a nivel de laboratorio.

### **3.3.2.2. Aislamiento de hongos entomopatógenos a nivel de laboratorio.**

#### **Muestras de suelo**

Una de las técnicas para aislar hongos entomopatógenos es la dilución seriada (Monzon, 2001). Para este proceso se tomó 10 g de suelo homogenizado, se depositó en frascos Erlenmeyer de 500 mL, al mismo tiempo se adicionó 50 mL de agua destilada y homogenizados durante 30 minutos en un agitador magnético. Se dejó reposar durante 1 hora para posteriormente realizar diluciones seriadas. De la muestra preparada (solución madre) se transfirió 1 mL en 3 tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada; este procedimiento se realizó hasta llegar a la dilución  $10^{-3}$ . Finalmente se sembraron 100  $\mu$ L de cada dilución sobre placas de Petri con medio de cultivo para microorganismos (Papa Dextrosa Agar: PDA). Para favorecer el crecimiento de los aislados, estos se incubaron durante 7 días a 30 °C.

#### **Técnica del insecto trampa**

De cada muestra de suelo homogenizado, se tomó 500 g de suelo y transferidos en un recipiente plástico, junto a ello se colocó 3 larvas de gorgojo de los Andes del último estadio. El suelo y las larvas contenidos en los recipientes plásticos fueron incubados a 27 °C durante 7 días. Luego de este periodo las larvas muertas fueron retiradas y colocadas en cámaras húmedas para favorecer el crecimiento del hongo entomopatógeno (Zimmermann, 1986).

#### **Aislamiento directo cadáveres de insectos silvestres**

Esta técnica consiste en obtener el hongo directamente del cuerpo del insecto. Pero antes, los insectos fueron examinados bajo un estereoscopio para corroborar la presencia de los hongos según la metodología de García *et al.* (2011). En insectos cubiertos con hongos entomopatógenos, el microorganismo fue aislado directamente con ayuda de una pinza esterilizada pasándolo luego a un medio nutritivo en placas con PDA. Y en insectos sin el crecimiento de hongos entomopatógenos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%.

También lavados con agua destilada acondicionados en cámaras húmedas e incubados por 7 días a 30 °C para el crecimiento del hongo entomopatógeno.

### **Trampas con arroz para microorganismos**

Se realizó una mezcla del arroz con 100 mL de agua destilada y homogenizados en un agitador magnético durante 20 minutos. Posteriormente se realizó “diluciones seriadas” (Monzon, 2001). Se tomó 100 µL de la dilución preparada para ser sembrados en placas con medio de cultivo (PDA) para el crecimiento de los HEP.

Todos las cepas obtenidas por los diferentes métodos de aislamientos fueron sometidos a observaciones macro y microscópicas para determinar al microorganismo deseado. Usando claves taxonómicas para entomopatógenos (Barnett y Hunter, 1998), se tomó pequeñas cantidades de esporas que fueron sembradas en otras placas con medio de cultivo de manera individual e incubándose a 30°C durante 15 días. A partir de las colonias individuales en crecimiento se sometieron a un proceso de purificación mediante el cultivo monospórico.

#### **3.3.2.3. Cultivo monospórico**

Siguiendo la metodología para un realizar un cultivo monospórico establecido por Cañedo y Ames (2004), los aislamientos fueron sembrados en un tubo inclinado con medio de cultivo PDA y se incubaron a 20 °C durante 7 días. A partir del tubo con el hongo en desarrollo se preparó una suspensión de esporas en 10 mL de agua destilada más 0.02 mL de Tween 20 y utilizando un hematocímetro se contabilizó el número de esporas bajo el microscopio de visión plana a 40X. Se realizaron hasta 3 diluciones para tener una suspensión a una concentración de 50 a 100 esporas por mililitro. De esta concentración se sembró 100 µL en una placa con medio PDA bajo condiciones asépticas e incubadas a 20 °C por un periodo de 7 días.

Finalmente se tomó una colonia en formación y transferida a otra placa con PDA para su posterior análisis de ADN.

#### **3.3.2.4. Claves taxonómicas para identificación de gorgojo de los Andes**

Para la clasificación taxonómica de estas especies, se utilizó claves descritas por Resh y Carde (2009), las claves principales estudiadas fueron: tipo de ciclo de vida, posesión de alas anteriores, protórax, ventritos del cuerpo del insecto, esternitos abdominales, antenas, y los genitales terminales.

Asimismo, se utilizó claves taxonómicas descritas por Cabello *et al.* (1997). Las claves estudiadas fueron: tipo, forma de antenas y tipo de cabeza.

Y para determinar el género de estas colectas, se utilizó claves taxonómicas descritas por Marvaldi y Lanteri (2005) y claves para el género *Premnotrypes* descritas por Pierce (1914), modificadas por Kuschel (1956) y descripciones morfológicas para *Premnotrypes* hechas por Alcázar y Cisneros (1999). La mayoría de los caracteres utilizados en la clave fueron características morfológicas externas y visibles a un microscopio estereoscopio; ya que la caracterización morfológica de los géneros de especies del complejo gorgojo de los Andes se basa en la convención de Agrupación Taxonómica Nacional de Especies, siendo así que la primera premisa es que los gorgojos son adultos de larvas que se desarrollan en tubérculos de papa (Alcázar y Cisneros, 1999). Para la caracterización del género se tomó características morfológicas externas y una de ellas fue el edeago del macho, una clave de mayor uso para identificación de especies de gorgojos. También se evaluó el tipo de cabeza, mandíbulas, cúspide mandibular o pieza decidua, antenas, escleritos torácicos, élitros e intergrooves. Otras claves complementarios fueron: escalas, pubescencia, setas, surcos, tubérculos y callos.

### **3.3.2.5. Claves de identificación de hongos entomopatógenos**

Para la identificación macroscópica se ha utilizado claves y descripciones morfológicas para hongos entomopatógenos descritos por Cañedo y Ames (2004), lo cual se basa en observaciones sobre el crecimiento, color y forma de las colonias. Y para la identificación microscópica se ha utilizado las claves taxonómicas, descripciones e ilustraciones de diferentes géneros de hongos entomopatógenos descritos por Barnett y Hunter (1998). Las claves estudiadas estuvieron basadas en descripciones sobre tipo, forma de hifas y conidias.

### **3.3.2.6. Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento de hongos entomopatógenos**

Se utilizó el Kit de extracción Zymo “Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit”, Cat. N° D6005.

Para un rendimiento óptimo, se agregó 100 mL de beta-mercaptoetanol al tampón de lisis genómico a una dilución final de 0.5% (v/v).

En un tubo ZR BashingBead Lysis (0,1 mm y 0,5 mm), se añadió 1 disco de agar con células fúngicas en crecimiento. Luego se adicionó 750 µL BashingBead Buffer al tubo y calentados durante 5 minutos en un termobloque rectangular a 65 °C para diluir el agar sólido; los mismos que fueron procesados a velocidad máxima en un vórtex durante 5 minutos y centrifugados a 11,000 rpm durante 1 minuto. Todo el sobrenadante se transfirió a un Filtro Zymo-Spin III.F en un tubo colector y centrifugados a 8,000 rpm durante 1 minuto. Así mismo se añadió 1,200 µL de Tampón de Lisis Genómico. De este volumen se transfirió 800 µL de la mezcla a una columna Zymo-Spin IIC en un tubo de recogida y centrifugados a 10,000 rpm por 1 minuto. Este proceso se repitió dos veces. Luego se añadió 200 µL de ADN de pre-lavado de amortiguación a la columna Zymo-Spin IIC en un nuevo tubo de recogida y centrifugados a 10,000 rpm por 1 minuto. También se adicionó 500 µL de g-DNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin



IIC y centrifugados a 10,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se transfirió la columna Zymo-Spin IIC a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL y se añadió 90 µL de Tampón de Elución de ADN en dos volúmenes de 45 µL directamente a la matriz de la columna y centrifugados a 15,000 rpm durante 30 segundos.

Para el proceso de amplificación se utilizó el gen EF-1. El cual fue amplificado con los primers EF-1620 (forward) y EF-1.R1018 (reverse). Cada loci fue amplificado mediante Reaccion en Cadena de Polimerasa (PCR) usando reactivos Bioneer (Bioneer, Daejeon, Corea) en la siguiente mezcla de reacción de 96 µL: 60 µL de 10 mM dNTP Master mix; 31.2 µL de agua destilada; 2.4 µL de primers sentido y antisentido de 5-10 µM y 2 µL de ADN genómico. El protocolo de PCR fue en los siguientes parámetros: pre-denaturación y activación de enzimas a 94 °C durante 2 minutos, 94 °C durante 30 segundos (denaturación) seguido de 40 ciclos de 55 °C durante 1 minuto (annealing), 72 °C durante 1 minuto (extensión) y 72 °C durante 10 minutos (extenaión final).

La evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido se realizó en geles de agarosa al 1.6% corridos en tampón TAE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) durante 15 minutos. Los geles se tiñeron con Safa DNA Gel Stain a una concentración final de 0.025 µL. Las muestras fueron purificados utilizando el kit de limpieza Zymo Reseach DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>- 5 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Las secuencias de la cadena delantera y reversa de los genes fueron secuenciadas comercialmente con Macrogen, Daejeon, Corea y los electroferogramas se editaron manualmente utilizando el software Chromas v1.45. Las muestras de PCR que no fueron amplificadas adecuadamente se desecharon para repetir el proceso.

### **3.3.2.7. Extracción de ADN, amplificación y secuenciamiento de gorgojo de los Andes**

Se utilizó el Kit de extracción Zymo “Quick-DNA™ Tissue/Insect Miniprep Kit”, Cat. N° D6016. Se usó el protocolo del kit de extracción pero con algunas modificaciones.

Las muestras de gorgojos fueron pulverizadas en un crusher después de haberse sumergido en nitrógeno líquido. Para aumentar la temperatura se calentó en un termobloque por 5 minutos a 65 °C. Así mismo se añadió 750 µL de BashingBead Buffer y agitados en un vórtex. Se retiró el sobrenadante y se dejó reposar unos 10 minutos para precipitar las partículas más grandes. Luego de este periodo el sobrenadante se transfirió en tubos de ZR BashingBead Lysis (2.0 mm) y centrifugados a 10,000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante centrifugado fue transferido a un Zymo-spin III.F Filtrar en un tubo de recolección y centrifugados a 10,000 rpm durante 1 minuto. Así mismo se les agregó 1,200 µL de Tampón de Lisis Genómico al filtrado en la colección de tubos. De éste volumen se transfirió 800 µL de la mezcla a una columna<sup>1</sup> Iy Zymo-Spin en un tubo colector y centrifugados a 10,000 rpm por 1 minuto y se descartó el flujo del tubo de recolección, proceso que se repitió dos veces hasta completar el volumen agregado (1,200 µL). Para el inicio del proceso del lavado se añadió 200 µL de ADN de pre-lavado de amortiguación a la columna Zymo-spin IIC en un nuevo tubo de recogida y centrifugados a 10,000 rpm por 1 minuto; luego se agregó 500 µL de tampón de lavado g-DNA a la columna Zymo-Spin IIC y centrifugado a 10,000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se transfirió la columna Zymo-Spin IIC a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml agregando 45 µL de tampón de elución de ADN directamente a la matriz de la columna; lo mismos que fueron centrifugados a 15,000 rpm durante 1 minuto para eludir el ADN. Este procedimiento se repitió dos veces hasta completar 90 µL de tampón de elución de ADN.

Para el proceso de amplificación se utilizó el gen Citocromo Oxidasa I (COI). Cada loci fue amplificado en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) usando reactivos Bioneer (Bioneer, Daejeon, Corea) en la siguiente mezcla de reacción de 88  $\mu$ L: 55  $\mu$ L de 10 mM dNTP Master mix; 28.6  $\mu$ L de agua destilada; 2.2  $\mu$ L de primers sentido y antisentido de 5–10  $\mu$ M y 2  $\mu$ L de ADN genómico. El protocolo de PCR para gen mitocondrial COI se realizó usando los siguientes parámetros: pre-denaturación y activación de enzimas a 95 °C durante 1 minuto, 94 °C durante 30 segundos (denaturación) seguido de 40 ciclos a 48 °C durante 30 segundos (annealing), 68 °C durante 45 segundos (extensión) y 72 °C durante 5 minutos (extensión final).

La evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido se realizó en geles de agarosa al 1.6% corridos en tampón TAE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) durante 15 minutos. Los geles se tiñeron con Safa DNA Gel Stain a una concentración final de 0.025  $\mu$ L/mL. La visualización se realizó con un fotodocumentador en luz azul. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Zymo Research DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Las secuencias de la cadena delantera y reversa de los genes COI fueron secuenciadas comercialmente con Macrogen, Daejeon, Corea. Los electroferogramas se editaron manualmente utilizando el software Chromas v1.45 y las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA 7. Así mismo, se realizó un BLAST a través de la plataforma del NCBI con las secuencias editadas para confirmar la amplificación adecuada de esta especie.

### **Análisis de secuencias**

Las secuencias fueron alineadas y editadas manualmente con el programa Chromas y MEGA 7. Se realizó un BLAST (Herramienta Básica de Alineamiento Local) a través de la plataforma del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) con todas las secuencias tanto del complejo gorgojo de los Andes como de hongos entomopatógenos para confirmar la amplificación exitosa de la región

deseada. Para el análisis del gorgojo de los Andes se tomó a la especie de *Cosmopolites sordidus* como grupo externo que está disponible en el GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>: AY131111). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 y la construcción de la filogenia para el complejo se desarrolló mediante el método de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987). El análisis de agrupamiento con el método de Neighbor-joining. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de distancia p y están en las unidades del número de diferencias de base (Nei y Kumar, 2000).

Para el análisis de los aislamientos autóctonos de hongos entomopatógenos se tomó a *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium brunneum* y *Metacordyceps taii* como grupo externo disponibles en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>: KR706491, FJ643538 y KJ536072. Para el análisis de la construcción del árbol filogenético se realizó el mismo procedimiento hecha para gorgojo de los Andes.

### **3.3.2.8. Pruebas de patogenicidad con adultos del gorgojo de los Andes**

Para obtener resultados más confiables se utilizó adultos con la misma característica morfológica en el aspecto de coloración, es decir adultos activos de color marrón claro, cuya coloración es un indicador del buen desarrollo de la cutícula. El proceso del test de patogenicidad para todos los tratamientos se realizó dos veces (lo cual se les denominó etapas). Para ello se utilizó ocho tratamientos con cinco repeticiones, incluye un testigo; cada repetición con 8 individuos. En total 40 individuos por tratamiento y 320 por etapa. Como el proceso se ha repetido dos veces, entonces se ha utilizado un total de 640 adultos en todo el proceso.

### **3.3.2.9. Preparación de la suspensión de conidios**

Las suspensiones de esporas de las cepas de hongos entomopatógenos fueron obtenidas mediante una dilución en serie y las esporas se obtuvieron raspando la superficie de la placa con una espátula dentro de una cabina de bioseguridad e introducidas en tubos de ensayo con

10 mL de agua destilada más 0.01 mL de Tween 20 (emulsión) y homogenizados en vórtex a 1,800 rpm por un lapso de 3 minutos. Para favorecer el proceso de contabilización se realizó la técnica de dilución en serie hasta llegar a una dilución apropiada para el conteo de esporas. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y se contabilizó en un microscopio de visión plana a 40X.

Para calcular el número de esporas se utilizó la siguiente fórmula: Conidias /mL = Número de Conidias contadas x 25,000 (factor de cámara) x factor de dilución, (Cañedo y Ames, 2004).

#### **3.3.2.10. Inoculación de la suspensión preparada**

Los adultos del gorgojo de los Andes utilizados en los bioensayos fueron obtenidos de la cría de laboratorio. Para este proceso se utilizó el método de inmersión (Barriga *et al.*, 2002). Se sumergieron en una suspensión de  $2.4 \times 10^9$  esporas/mL durante 40 segundos. Luego fueron retirados con una pinza y colocados sobre papel toalla para absorber el exceso de la solución conidial; finalmente fueron distribuidos en envases plásticos transparentes cubiertos con malla tull y ajustadas con una liga. Cada envase contenía en su base papel toalla humedecida y rodajas de papa como alimento que fue renovado cada 3 días y al mismo tiempo asperjando 1 mL de agua esterilizada para mantener una humedad relativa constante hasta el término del ensayo. Durante todo el proceso se trabajó con una temperatura media de 19.43°C y una Humedad Relativa de 69.43%. Las evaluaciones para el nivel de patogenicidad se realizaron a los 10, 15, 20, 25 y 30 días. El nivel de patogenicidad fue analizado mediante un Análisis de Componentes Principales en las dos etapas de desarrollo del test y el nivel de patogenicidad acumulada de todo el ensayo. La tabla 3 muestra la distribución de tratamientos del test de patogenicidad.

**Tabla 3.** Distribución de tratamientos para el test de patogenicidad de hongos entomopatógenos

N°	Tratamiento	Repetición	N° de individuos por tratamientos		Total	Dosis de aplicación
			Etapa 1	Etapa 2		
1	Testigo	5	40	40	80	10 mL agua destilada
2	AS2	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
3	AS3C	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
4	AS4A	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
5	AS1B	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
6	AS5A	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
7	AS4B	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL
8	AS5B	5	40	40	80	2.4x10 <sup>9</sup> e/mL

**Fuente:** Elaboración propia

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Diversidad genética de gorgojo de los Andes

#### 4.1.1. Observaciones morfológicas

Usando las claves taxonómicas descritas por Resh y Carde (2009), las especies fueron clasificados taxonómicamente dentro del orden Coleoptera, cuyas características principales fueron: los individuos presentan un ciclo de vida de tipo holometábolo, la posición de las alas anteriores son endurecidas denominadas elytra. El protórax se articula con el mesotórax. La forma del cuerpo de los adultos es deprimido, por lo que el fémur está situado en la superficie ventral del cuerpo. Los esternitos abdominales están más esclerotizados que los tergitas. Cuando estos están en reposo el aedeagus no es visible y el ovipositor se retrae cuando no esté en funcionamiento.

Asimismo; las claves taxonómicas descritas por Cabello *et al.* (1997), permitió clasificar a estos gorgojos dentro de la familia Curculionidae, cuyas características de mayor importancia para identificación fue la presencia de antenas acodadas y la cabeza prolongada en un rostro.

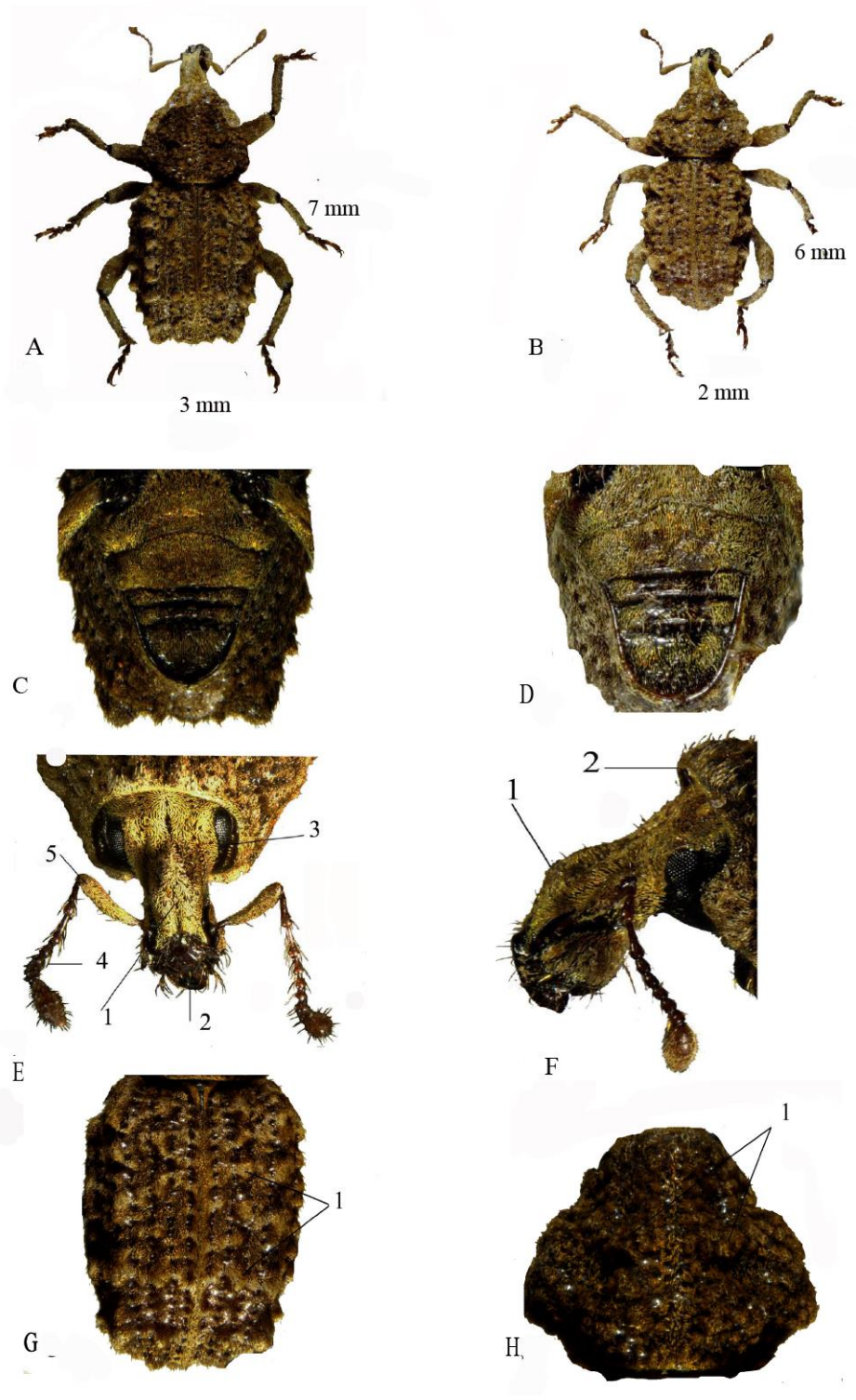
Finalmente, las claves taxonómicas para la clasificación de la subfamilia y género (Marvaldi y Lanteri 2005 y Pierce, 1914), además claves modificadas por Kuschel, (1956) y otras descripciones morfológicas para gorgojos (Alcázar y Cisneros 1999), nos permitió clasificar a estos insectos dentro del género *Premnotrypes*, siendo así que la primera premisa fue que estos gorgojos son Adultos de larvas que se desarrollan en tubérculos de papa (Alcázar y Cisneros 1999).

En la Figura 5 muestra la morfología de estos gorgojos, lo cual las hembras (A) son más grandes que los machos (B), por tanto se considera como “dimorfismo sexual” ya que todas las hembras llegaron a medir en promedio 7 mm de largo por 3 mm de ancho y los machos 6 mm de largo por 2 mm de ancho. La forma de los ventritos, es convexa en el cuarto ventrito formando un arco (C.1) para las hembras y en forma subtriangular para los machos (D.1). Morfología de cabeza y rostro; vista frontal (E) y vista lateral (F). Las

flechas y números indican caracteres y estados de carácter: rostro (E.1), mandíbula (E.2), ojos (E.3). Todos los adultos presentan antenas de tipo genículo-capitata, antenas con una curvatura entre el escapo (E.5) y pedicelo (E.4). Rostro con una curvatura muy pronunciada (F.1) y cabeza con arcos superciliares (F.2), con ojos compuestos, rostro o pico (epistoma, ranura para la recepción de escena antenal. Alas anteriores soldadas con presencia de tubérculos muy pronunciados, presentaron pubescencia, setas, surcos, tubérculos y callos en los elytros. (G.1). Escleritos torácicos (H.1).

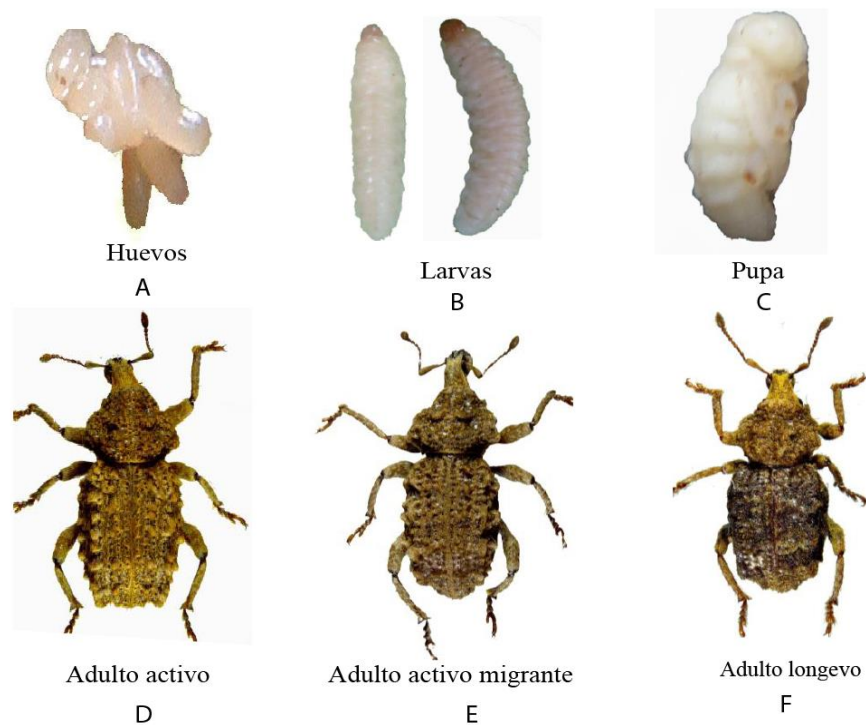
Sin embargo; estas características no fueron lo suficientemente para definir la especie correcta, ya que morfológicamente parecen ser diferentes en cuanto al tamaño, color, la posición y presencia de los tubérculos en las alas. Siendo así que solo se identificó adecuadamente hasta el género, donde todas las observaciones de estos gorgojos resultaron estar clasificados en un solo género (*Premnotrypes*).





**Figura 5.** Morfología de *Premnotrypes* sp.

El ciclo biológico en condiciones de laboratorio se reduce debido a que se ya no entran en la fase de “adulto invernante”, pasando directamente de pupa a adulto activo. En la Figura 6 se muestra todas las fases del ciclo biológico. Los huevos para esta especie son de la forma elípticos, inicialmente de color blancos y cremas cuando están a punto de la eclosión, siendo estos más susceptibles a la manipulación; las posturas son en forma de masa (Figura 6.A). Las larvas son de tipo apodas y de forma curculioniforme y una de sus características más resaltantes es la forma de una “C”; inicialmente son de color blancos y en el tercer y cuarto estadio se tornan blancos cremosos (Figura 6.B). La cabeza es de color marrón claro. Las pupas son de tipo líbera o exharata de color blancos cremosos (Figura 6.C), y se desarrollan dentro de un cocón. Los adultos recién emergidos de la cámara pupal son de color marrones claros (Figura 6.D), en unos días estos se convierten en adultos activos migrantes de color marrones (Figura 6.E) etapa en la que es recomendable realizar ensayos ya que presentan un buen desarrollo de la cutícula, ya que los adultos longevos son más propensos a la muerte natural. El ciclo culmina con adultos longevos de color marrón negro (Figura 6.F).



**Figura 6.** Fases del ciclo de vida de *Premnotrypes* sp

#### 4.1.2. Filogenia molecular

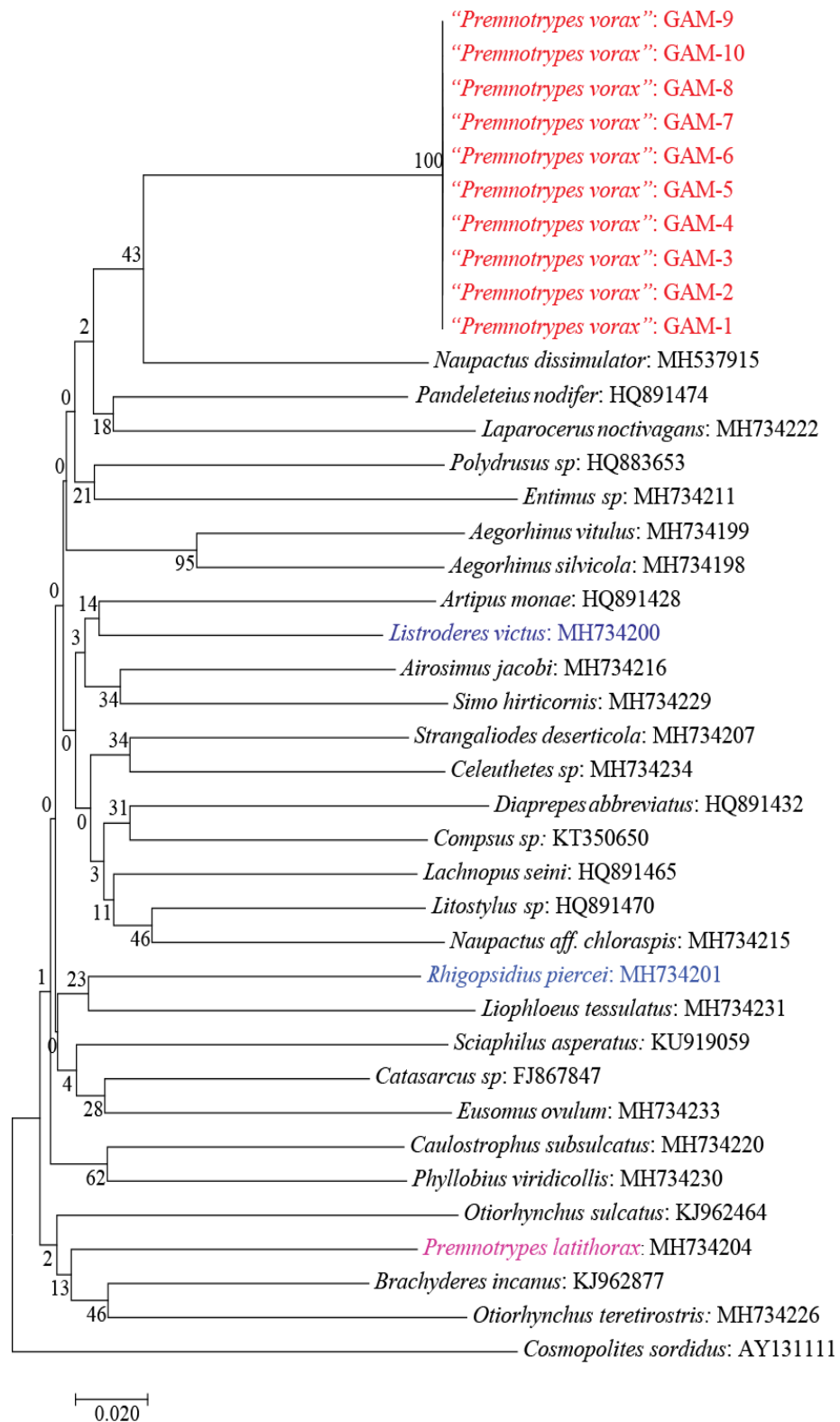
Debido a que el uso de claves taxonómica no fue lo suficientemente viable para determinar correctamente las especies, y para contrastar y confirmar los resultados preliminares del análisis morfológico, las muestras fueron sometidas a un análisis molecular seleccionando a 10 individuos adultos de gorgojo como parte del objetivo de estudio. En la Figura 7 se muestra la evaluación de la cantidad y calidad del ADN realizados en geles de agarosa y mediante un fotodocumentador permitió visualizar las bandas de desplazamiento del ADN de un tamaño de 400 pares de bases (pb). Lo que se determina que las amplificaciones han sido adecuadas para las siguientes 10 muestras (1=GAM-1C, 2=GAM-2, 3=GAM-3, 4=GAM-4, 5=GAM-5, 6=GAM-6, 7=GAM-7, 8=GAM-8, 9=GAM-9 y 10=GAM-10).



**Figura 7.** Productos de amplificación de gorgojo de los Andes para el gen COI.

Por otro lado, al construir el árbol más óptimo (Figura 3) con longitud de rama = 2.97039192 luego de 1,000 réplicas de bootstrap, cuyo análisis involucró 40 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. La barra indica el número de la sustitución de nucleótidos por sitio. Habiendo un total de 403 nucleótidos alineados, se determina que los especímenes secuenciados no presentan diferencias genéticas entre sí, correspondiendo todos a la misma especie. Sin embargo; al comparar las secuencias amplificadas de estos gorgojos con secuencias depositadas en el GenBank mediante la herramienta Blast, se encontró un porcentaje de 82 a 85% de homología con secuencias correspondientes a especies de la subfamilia Entiminae. Por lo tanto, el análisis morfológico y el análisis molecular se confirma que estas

secuencias corresponderían a “*Premnotrypes vorax*”, nombre que se le asigna temporalmente hasta ser corroborado con nuevas secuencias. Ya que se trata del primer secuenciamiento.

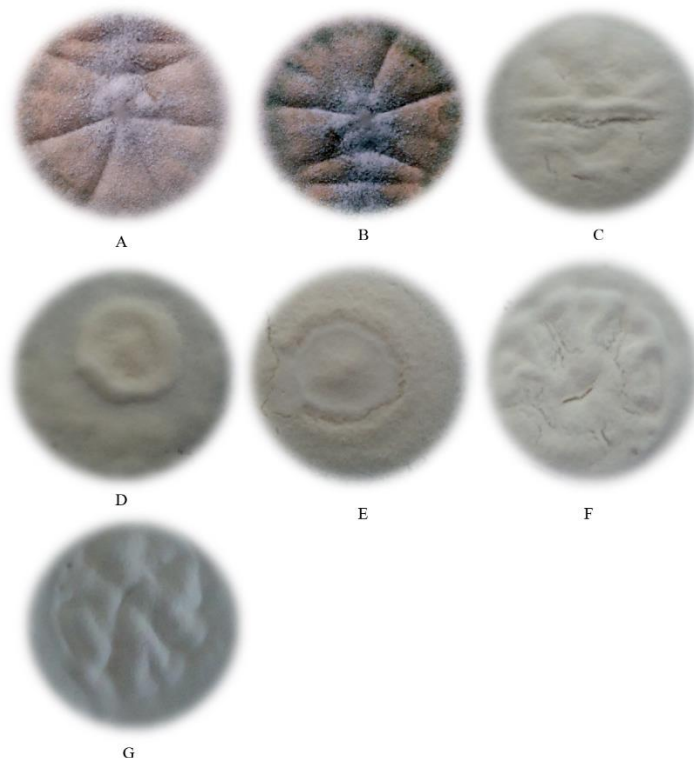


**Figura 8.** Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen COI.

## 4.2. Diversidad genética de hongos entomopatógenos

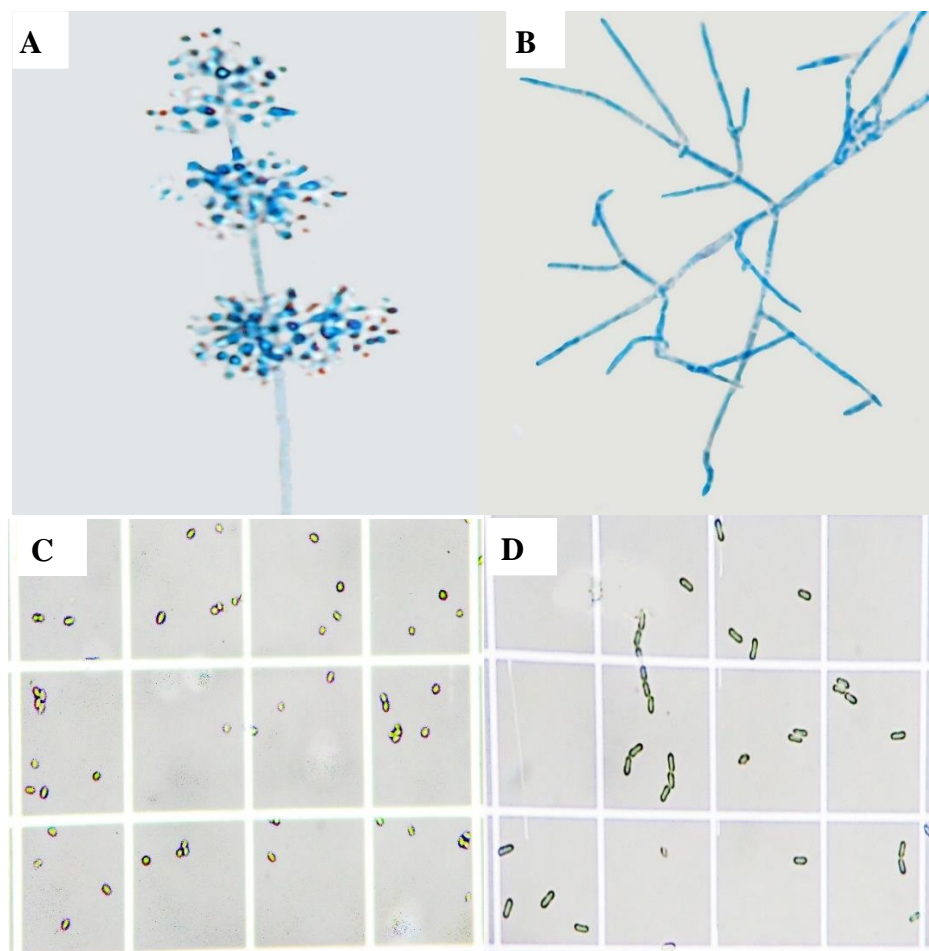
### 4.2.1. Observaciones morfológicas

El uso de las claves taxonómicas, observaciones macro y microscópicas, descripciones e ilustraciones para diferentes géneros de hongos entomopatógenos (Barnett y Hunter, 1998; Cañedo y Ames, 2004), nos ha permitido clasificar a siete cepas de hongos en dos géneros. En la Figura 9 se muestra las colonias de hongos entomopatógenos clasificados. Las colonias A y B pertenecen al género *Metarhizium* (AS5A y AS5B) dichas colonias son de forma circular de color cremas algonosomas inicialmente y cambian a verde grisáceo cuando las esporas van madurando. Su crecimiento en medios de cultivo PDA es lento. Las colonias C, D, E, F y G pertenecen al género *Beauveria* (AS1B, AS4B, AS4A, AS3C y AS2) los cuales presentan diferentes características macroscópicas. Algunas colonias son de forma circular uniforme (C y D); otras son de forma circular pero con áreas sobresalientes dando origen a colonias regulares (E y F) y colonias irregulares (G).



**Figura 9.** Estructuras macroscópicas de hongos entomopatógenos

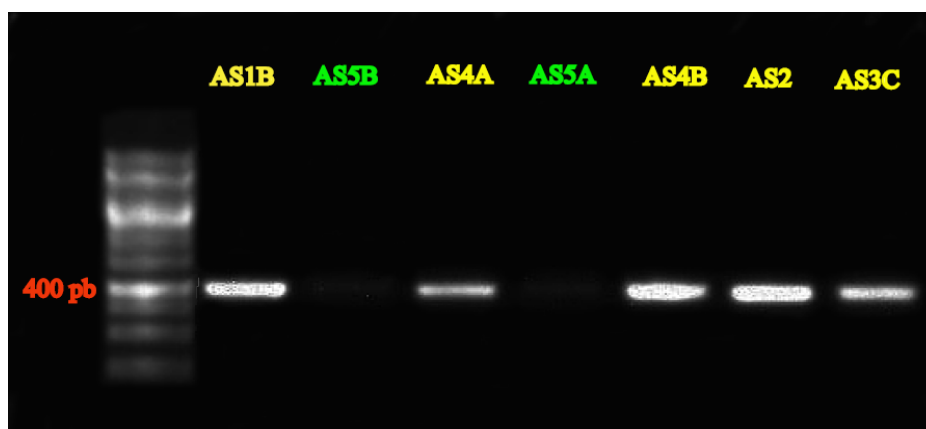
Las estructuras microscópicas de los hongos son una de las claves taxonómicas para su identificación adecuada, en la Figura 10 se muestra las principales características (hifas y conidias) de mayor relevancia para su identificación. Las cepas AS1B, AS1A, AS2, AS3A y AS4B, presentan un raquis denticulado que sostiene una conidia (Figura 10.A). Estas son hialinas, globosas o subglobosas (Figura 10.C) que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta, dichas características nos confirma que estas cepas pertenecen al género *Beauveria*. Y las cepas AS5A y AS5B presentan conidióforos que nacen del micelio y es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada septo (Figura 10.B). Los fiálides son cilíndricos en forma de una clava, y las conidias son unicelulares, de forma cilíndricas formando cadenas o forma de salchichas (Figura 10.D).



**Figura 10.** Estructuras microscópicas de hongos entomopatógenos.

#### 4.2.2. Filogenia molecular

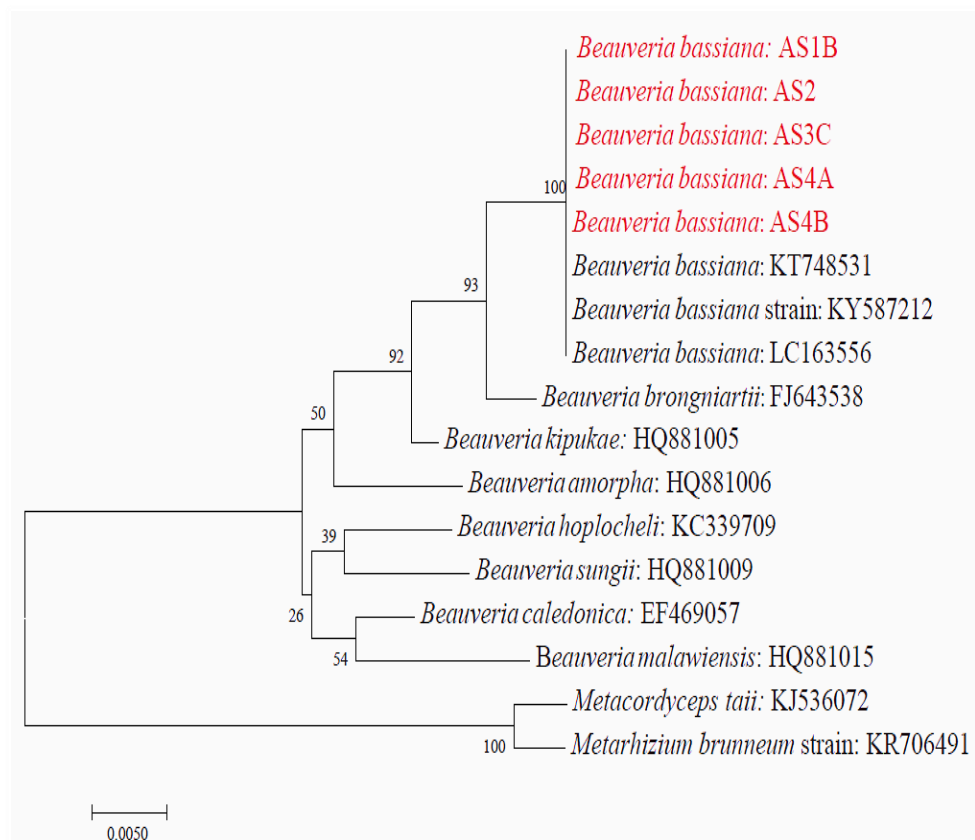
La caracterización morfológica de los aislamientos de hongos entomopatógenos nos permitió identificar hasta el género, por lo tanto dichos aislamientos fueron sometidos a una caracterización molecular para determinar la especie correspondiente de cada aislamiento. Para el proceso de extracción y amplificación se utilizó el gen TEF-1 para hongos y cada loci fue amplificado con la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) usando reactivos Bioneer. Usando el protocolo de PCR para el gen nuclear TEF-1  $\alpha$ , se obtuvieron bandas electroforéticas. En la Figura 11 se muestra la evaluación de la cantidad y calidad del ADN realizados en geles de agarosa y la visualización con un fotodocumentador permitió visualizar las bandas de desplazamiento del DNA de un tamaño de 400 pb para los siguientes aislamientos: AS1B, AS4A, AS4B, AS2, AS3C, AS5B y AS5A.



**Figura 11.** Productos de amplificación de hongos entomopatógenos para el gen TEF-1.

A partir del proceso anterior se determinó siete cepas de hongos entomopatógenos divididos en dos géneros y analizados independientemente. Estas fueron comparadas con otras secuencias descargadas del GenBank. En la Figura 12 se muestra la construcción del árbol filogenético más adecuado para especies del género *Beauveria*, esto se infirió utilizando el método de Neighbor joining (Saitou y Nei 1987). Se obtuvo el árbol más óptimo con longitud de rama = 0.77466527 luego de 1,000 réplicas (Felsenstein, 1985). El análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd

+ Noncoding. Hubo un total de 502 posiciones en el conjunto de datos final. Nuestros aislamientos presentaron un porcentaje de 100% de homología con secuencias correspondientes a regiones TEF-1 de otras especies de hongos entomopatógenos. Por lo tanto, en el análisis resultó que los aislamientos AS1B, AS3C, AS4A, AS2 y AS4B corresponden a *Beauveria bassiana* con 0% de variabilidad genética entre estas 5 aislamientos frente a otras especies ya identificadas.

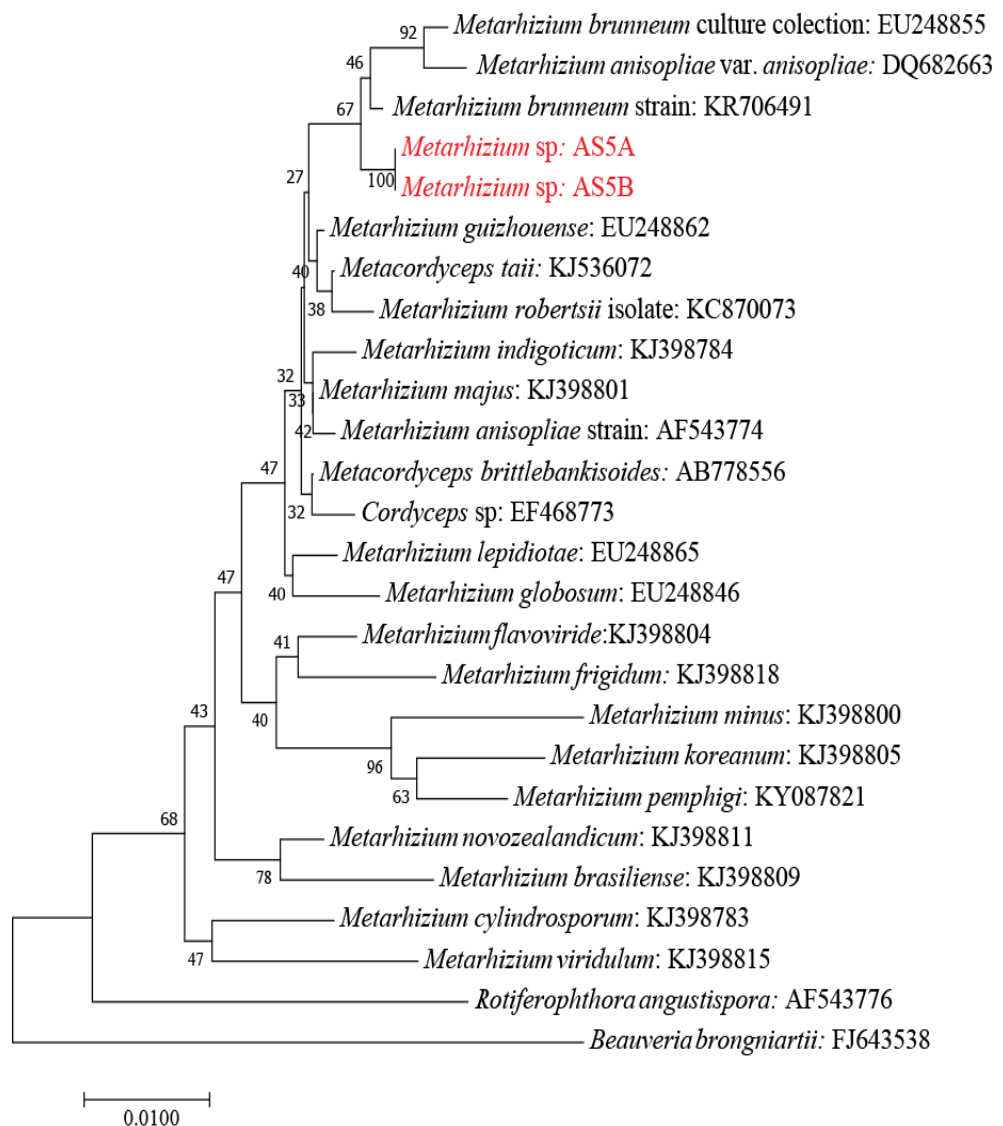


**Figura 12.** Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen TEF1 para especies de *Beauveria*.

Por otro lado, la Figura 13 muestra la construcción del árbol filogenético más adecuado para especies del género *Metarhizium*. Valores en las ramas indican son valores del bootstrap. La barra indica el número de sustitución de nucleótidos por sitio. Se infirieron utilizando el método de Neighbor-joining en la prueba de arranque de 1,000 repeticiones. El análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Hubo un total de 576 nucleótidos en el conjunto de datos finales. Los valores en las ramas indican valores del



bootstrap. Barra indica el número la sustitución de nucleótidos por sitio. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba de arranque (1,000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. Por tanto, resultó que los aislamientos AS5A y AS5B presentaron 0% de variabilidad genética, lo cual se confirma que pertenecen a la misma especie; sin embargo, frente a otras secuencias ya identificadas presentaron cierta variación porcentual de homología, por lo que se afirma que no pertenecen a ninguna de estas secuencias identificadas.



**Figura 13.** Árbol filogenético basado en inferencias del Neighbor joining del gen TEF-1 para especies de *Metarhizium*.

La clasificación final para especies de *Metarhizium* sería de la siguiente forma:

Fungi  
Ascomycota  
Pezizomycotina  
Sordariomycetes  
Hypocreales  
Clavicipitaceae  
*Metarhizium* (Sorokin, 1883)  
***Metarhizium sp.***

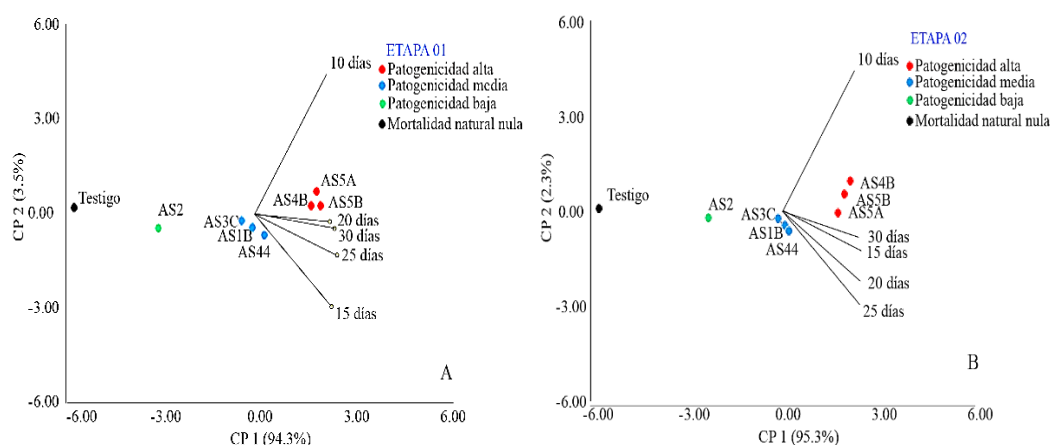
Y la clasificación para especies de *Beauveria* sería de la siguiente manera:

Fungi  
Ascomycota  
Pezizomycotina  
Sordariomycetes  
Hypocreomycetidae  
Hypocreales  
Cordycipitaceae  
*Beauveria* Vuillemin (1912)  
***Beauveria bassiana***

#### **4.3. Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre gorgojo de los Andes**

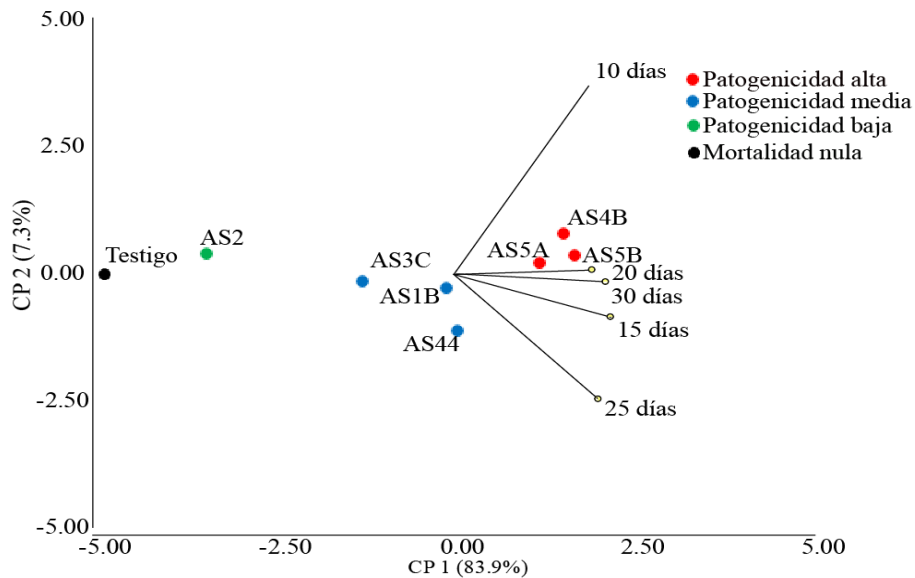
A pesar de que todas las cepas de *B. bassiana* y *Metarhizium sp.*, resultaron ser patogénicas para los adultos de *P. vorax* se observaron diferencias significativas en el tiempo de mortalidad (10, 15, 20, 25, 30 días). Esto explica que la reproducción del entomopatógeno es más severo y su acción de patogenicidad se vuelve más agresiva; por lo tanto la activación de los mecanismos de defensa el insecto es menos eficiente. En la Figura 14 se muestra el nivel de patogenicidad. En la primera etapa (Figura 14.A), los aislamientos AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8) presentaron el mayor índice de patogenicidad cuyas cepas resultaron ser más efectivas a partir de los 10 días y luego fue incrementándose entre los 15 a 30 días, aunque no necesariamente alcanzaron el 100%. Mientras que los

aislamientos AS3C (T3), AS4A (T4) y AS1B (T5) presentaron un índice de mortalidad menor considerándolo como el nivel de patogenicidad media. En la segunda etapa de desarrollo del test (Figura 14.B) muestra la separación de los mismos grupos de tratamientos de la primera etapa. Los aislamientos AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8) resultan ser más efectivos, seguidos por los aislamientos AS3C (T3), AS4A (T4) y AS1B (T5) y el aislamiento menos efectivo fue el AS2 (T2). La diferencia significativa entre los grupos de tratamientos nos ha permitido seleccionar las mejores cepas para estudios complementarios.



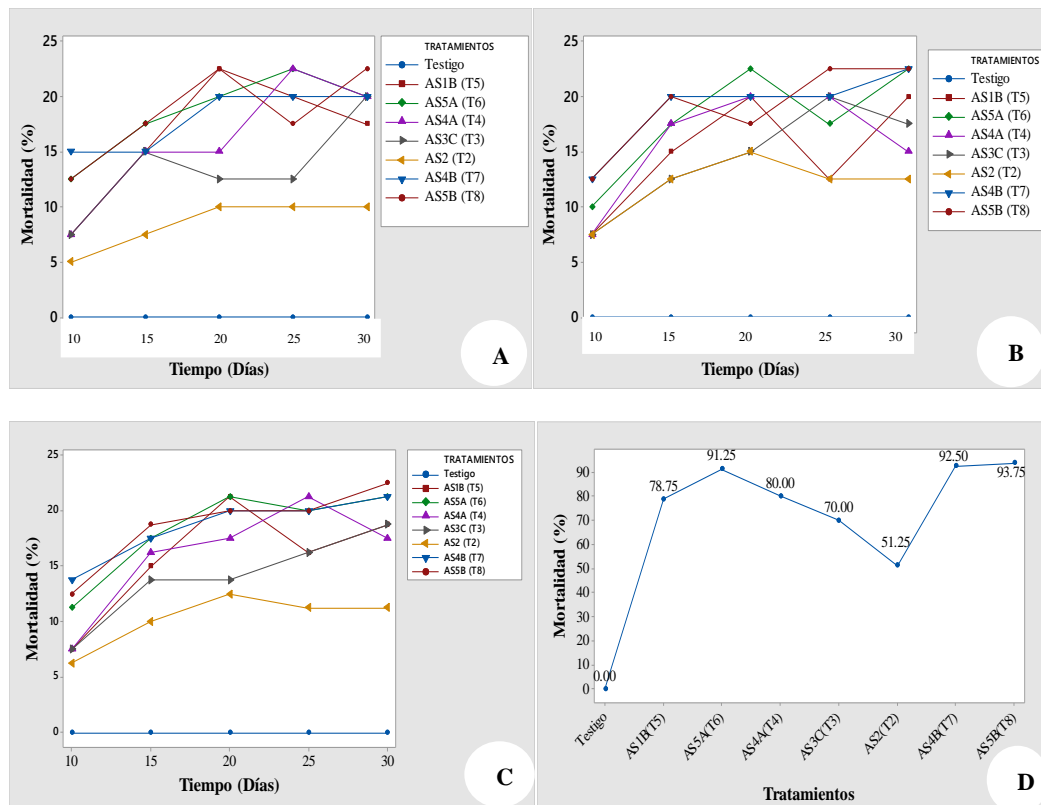
**Figura 14.** Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp, evaluados en dos etapas: etapa 1 (A) y etapa 2 (B).

En la Figura 15 se muestra los resultados del nivel de patogenicidad acumulado. Los resultados demuestran que la actividad biológica de los aislamientos de hongos entomopatógenos sobre adultos de *P. vorax*, presentan diferencias significativas entre tratamientos para la variable patogenicidad con una correlación positiva entre los días de evaluación. Los aislamientos que mejor respuesta mostraron fueron AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8), de los cuales presentaron niveles de patogenicidad superior a 90% durante los 30 días. Esto resultó como el grupo de mayor nivel de patogenicidad siendo a su vez estadísticamente iguales entre sí; mientras que los aislamientos AS3C (T3), AS4A (T4) y AS1B (T5) tuvieron porcentajes de mortalidad más bajos que los anteriores, estadísticamente se comportaron similares entre ellas. Por otro lado, el aislamiento AS2 (T2) siempre presentó un nivel de patogenicidad más bajo (51.25%).



**Figura 15.** Niveles de patogenicidad de *B. bassiana* y *Metarhizium* sp.

En la Figura 16 se muestra el porcentaje de mortalidad con respecto al tiempo en dos etapas. En la primera etapa (Figura 16.A) los aislamientos AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8) presentan los mejores resultados con mortalidades superiores al 10% a partir de los 10 días, luego se incrementa a los 15, 20, 25 y 30 días. El aislamiento AS2 (T2) presentó el nivel de patogenicidad menos efectivo durante todo el test. Por otro lado, en la segunda etapa (Figura 16.B) los mejores aislamientos más efectivos son los mismos de la primera etapa y el aislamiento AS2 (T2) resultó ser el menos efectivo. Asimismo, en la Figura 16.C muestra el porcentaje de mortalidad acumulado, lo cual resultó que los aislamientos AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8) siempre resultaron ser los mejores durante los 30 días, los aislamientos AS3C (T3), AS4A (T4) y AS1B (T5) presentan mortalidades inferiores pero superiores al aislamiento AS2 (T2). Este último es considerado como el menos efectivo. Finalmente la Figura 16.D muestra el porcentaje de mortalidad por cada aislamiento (tratamientos) de manera independiente, resultados que se demuestra que los aislamientos AS5A (T6), AS4B (T7) y AS5B (T8) fueron los mejores (91.75, 92.5 y 93.75%), los aislamientos AS3C (T3), AS4A (T4) y AS1B (T5) se mantuvieron en un nivel medio de patogenicidad (70, 78.75 y 80%) y el aislamiento AS2 (T2) siempre fue el menos efectivo (51.25%).



**Figura 16.** Porcentaje de mortalidad de gorgojo de los Andes en función al tiempo.

El la Figura 17 se muestra el efecto de las cepas de entomopatógenos sobre adultos de gorgojo de los Andes. Debido al crecimiento de micelio y al transcurrir los días se observó esporulación sobre los adultos muertos. La muerte de estos adquirieron una consistencia dura, luego el cuerpo fue cubierto de una tonalidad blanquecina para *Beauveria bassiana* y verdosa para *Metarhizium* sp. Los adultos de *P. vorax* muerto con síntomas de “muscardina blanca” por causa de *Beauveria bassiana*, el signo del hongo aparece en todas las partes del cuerpo del insecto de manera abundante, la mayor parte son conidios de apariencia polvorienta de color blanco y se tornan de color crema cuando estos van madurando (A). El tiempo de maduración depende de dos factores más importantes (humedad relativa y temperatura), a mayor humeada y temperatura, más rápido es el desarrollo de la micosidad del patógeno. Por otro lado, *Metarhizium* sp., presenta una esporulación algodonosa, inicialmente blanca y cambiando a verde grisáceo cuando los conidios han madurado sobre el hospedero (B), el nivel de micosidad es alto a pesar de las condiciones ambientales bajas.



**Figura 17.** Esporulaci3n de *B. bassiana* (A) y *Metarhizium* sp (B). sobre adultos de *P. vorax*..

## V. DISCUSIÓN

El uso de claves taxonómicas para la clasificación de insectiles (Resh y Carde, 2009; Cabello *et al.*, 1997; Marvaldi y Lanteri, 2005) resultó poco e ineficientes para el estudio definitivo y confiable a nivel de especie de estos gorgojos, ya que hubo mucha variabilidad morfológica en el tamaño y la coloración. Por tanto, el uso de otros métodos de identificación como el molecular es el más recomendado.

La especie *P. vorax* identificada en este estudio, se caracteriza por poseer un rostrum con fuerte curvatura dorsal, los elytros son un poco planos y presenta tubérculos muy pronunciados hasta en el tórax, son de color marrones en estado adulto activo y filófagos por naturaleza, presentan dimorfismo sexual, resultados que concuerdan con las descripciones de Pierce (1914), y Kuschel (1956), para la especie de *P. vorax*.

El análisis molecular efectuado en esta especie de G.A, deja mostrar que es el primer estudio en secuenciar estos organismos y confirmar su distribución geográfica en el Norte del país. Aquí se incluye la región Amazonas donde esta especie podría convertirse en un problema clave en el futuro próximo para los productores en los cultivos de papa debido a su difícil control, pues las larvas son los que ocasionan el mayor daño (Alcázar, 1997).

Asimismo; las secuencias generadas en este análisis molecular para esta especie difiere ampliamente de *Premnotrypes latitorax* (Marvaldi *et al.*, 2018) a pesar de pertenecer al mismo género. Las secuencias de esta especie se encuentra filogenéticamente más próxima a otros géneros, tal es el caso de *Naupactus*, *Rhigopsidius*, *Listroderes* y *Phyrdenus* (Marvaldi *et al.*, 2018). Esto confirma la lejanía evolutiva existente entre *P. latitorax* y esta nueva secuencia. Por lo tanto; esta especie podría ser considera como *P. vorax*, nombre que se le asigna temporalmente hasta que nuevas colectas de *P. vorax* de su localidad tipo sean secuenciadas para confirmar la adecuada posición taxonómica con respecto al género *Premnotrypes*, pues este género fue creado teniendo a *Premnotrypes solani* como especie tipo, al mismo tiempo se crea el género *Trypopremnon* para ubicar a la especie *T. latitorax* (Pierce, 1914), luego fue transferido a *Premnotrypes* (Kuschel, 1956), *Premnotrypes solani* y *T. Iatithorax* son consideradas como las dos especies más importantes en la Literatura Entomológica Peruana por un largo periodo (Pierce, 1914; Wille, 1952), mientras que *P. vorax* fue descrita por primera vez en Colombia por Hustache en 1933 (Alcázar, 2002).

Lo descrito por Kuschel (1956), quien señaló que hay poca claridad en los grupos taxonómicos superiores de los Curculionidae, donde toda consideración sobre sus relaciones filogenéticas en la actualidad todavía está improcedente debido a que si se hace derivar las especies de la tribu Premnotrypini podrían haberse separado de una de las dos subfamilias: Los Olydorrhiniinae o Eriirhininae, para incluirse junto a las demás especies de la subfamilia Leptopiinae.

Los tres géneros más perjudiciales que forman el complejo "gorgojo de los Andes" pertenecen a diferentes subfamilias de la familia Curculionidae (Wibmer y O'Brien, 1986) y después de un análisis molecular el género *Premnotrypes* hoy pertenece a la tribu Premnotrypini y a la Subfamilia Entiminae (Marvaldi *et al.*, 2018).

En el Perú la distribución de *P. vorax* hasta la actualidad está registrada desde hace décadas por su amplia distribución en países como Colombia, Venezuela, Ecuador y Norte de Perú, específicamente concentrándose en la región Cajamarca (Alcázar, 2002). Este estudio confirma su expansión y se incluye a la región de Amazonas como la nueva zona de distribución. En este sentido, esta especie no se consideraría como endémica debido a que ambas regiones son colindantes y son productoras de papa en espacios que sobrepasan los 2,800 m.s.n.m. Por lo tanto; la nueva geografía de amplitud de su distribución de *P. vorax* sería a causa de la falta de control y conocimiento de los productores de papa (Alcázar, 2002). Ya que en Cajamarca esta especie ha sido y es considerada una plaga clave y de importancia económica en sus cultivos que genera severos daños generando pérdidas cuantiosas (Alcázar, 1997).

Por otro lado; los hongos entomopatógenos son considerados como los patógenos más importantes contra una diversidad de insectos de Lepidópteros, Coleópteros, Ortópteros ya que interactúan en la naturaleza de manera natural, por lo que se les considera como autóctonos o nativos (Alves, 1998). Las especies más comunes como controladores de insectos son los hongos Deuteromycetes: del cual sobresalen especies como *Isaria fumosorosea*, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium*. Estos últimos son los más estudiados por su amplia distribución geográfica (Monzón, 2001).

La caracterización morfológica de estos asilamientos de hongos entomopatógenos nos permitió clasificarlos el género, pero no la especie, debido a la alta diversidad de especies de *Beauveria* (32 en el mundo) y *Metarhizium* (18 en el mundo) ([GBIF](#) y [EOL](#), s.f). Por



lo tanto, cabe mencionar que se necesita estudios más específicos y detallados para poder diferenciar una especie de otra, e incluso las variedades, un trabajo que se requiere de mayor esfuerzo y tiempo.

Sin embargo; existe el método del análisis molecular para determinar de manera eficiente las especies de dichos microorganismos. Siendo así, los aislamientos generados en este proyecto fueron sometidos a este tipo de análisis. Los resultados permitieron determinar siete cepas de hongos agrupados en dos géneros (*Beauveria* y *Metarhizium*). La presencia de solo estos dos hongos se debe a la temporada de colección, es decir; en climas húmedos *Beauveria bassiana* puede prosperar muy bien y lo encontramos en suelos con alta materia orgánica. Según García *et al.* (2011), *Metarhizium* prospera muy bien tanto en temporadas húmedas como secas, presentándose casi en todo tipo de suelos.

El tipo de análisis molecular aplicados para los aislamientos de hongos entomopatógenos (AS1B, AS4A, AS4B, AS5A, AS5B, AS2 y AS3C) mediante la amplificación del gen TEF-1, se confirmó la idoneidad de este gen para la correcta identificación de hongos entomopatógenos. Resultados que confirman a los de Short *et al.* (2013), quienes recomiendan el uso de locus genéticos (el factor de alargamiento de la traducción 1- $\alpha$  TEF1) y el gen de la ARN polimerasa II (RPB2). Por lo que futuros estudios deben procurar el uso de más de un gen para establecer la correcta identificación de organismos cercamente emparentados.

Finalmente; el análisis del nivel de patogenicidad de nuestros aislamientos de hongos entomopatógenos identificados molecularmente, resultaron ser patogénicas en tres diferentes niveles: alta, media y baja. El nivel de patogenicidad alta se debe al tipo de muestra utilizada para el aislamiento de los hongos entomopatógenos. Es decir, los aislamientos que fueron aislados por el método del insecto trampa y de hospederos de cadáveres de insectos nativos resultaron ser más patogénicas que los aislamientos directos de muestras de suelo, tal como lo señala Pari *et al.* (2016), quien reportó que el nivel de patogenicidad depende del tipo de muestra utilizada para su aislamiento. Además, los substratos utilizados para la multiplicación, la conservación y desarrollo adecuado influyen en el nivel de patogenicidad (Barajas-Ontiveros *et al.*, 2009).

Por otro lado, estos resultados no guardan mucha relación con otros trabajos de investigación donde se reportaron que aislamientos de *Metarhizium* causaron

mortalidades superiores a 50% a partir de 19 días en concentraciones de  $10^9$  esporas/mL y para aislamientos de *Beauveria bassiana* han obtenido mortalidades de 50% en periodos cortos (4 días) a una concentración de  $1 \times 10^9$  esporas/mL (Sandoval *et al.*, 2018). Mientras que Rivera y Pinto (2001), encontraron una mortalidad acumulada del 100% antes de los 16 días para adultos de *Premnotrypes vorax* provenientes de cría utilizando una dosis de  $1 \times 10^8$  esporas/mL y en adultos colectados de campo presentaron mortalidades mayores de 90% con aislamientos de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Estas diferencias podrían ser a causa de la edad de los adultos utilizados como muestra para inoculación y lo más importante por las condiciones ambientales. Puesto que en otros estudios trabajaron con una humedad relativa superior a 75% y una temperatura mayor a 20 °C, factores ambientales superiores a los nuestros, cuya temperatura media fue de 19 °C y 69% de humedad relativa, lo que explicaría las diferencias encontradas.

Durante el ensayo se utilizó insectos con características semejantes en la coloración y el tamaño, por tanto hubo poca similitud en la distribución de la mortalidad con respecto al tiempo; esta diferencia presentada depende del origen y la edad del insecto. Los insectos provenientes de crianza masiva son más susceptibles a la micosis producida por los hongos entomopatógenos; por lo que existe una gran relevancia que tiene la condición fisiológica de un insecto en la expresión de la patogenicidad de un hongo entomopatógeno (Rivera y Pinto, 2001). Al igual que en larvas que son muy susceptibles a los hongos entomopatógenos que pueden alcanzar mortalidades del 100% (Villamil *et al.*, 2014).

Además; los resultados de mortalidad alcanzada en este test de patogenicidad estarían en función a la dosis de solución conidial empleada con respecto a las condiciones ambientales (Temperatura y Humedad Relativa) ya que estos factores son determinantes en el nivel de patogenicidad del hongo. Es decir; el espectro de acción de *B. bassiana* y *Metarhizium* está estrechamente relacionado con la radiación solar, pH, temperatura, humedad relativa y materia orgánica (Peña *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2004; Cañedo y Ames, 2004), lo cual ha generado niveles altos de patogenicidad de cepas autóctonas incrementando su efectividad desde los 5 días alcanzando el 100% de mortalidad entre los 10 a 25 días (Barriga *et al.*, 2002). Según las condiciones ambientales establecidas (HR: 69.92% y T: 19.43 °C), las cepas de *Metarhizium* sp. (AS5A Y AS5B) y *B. bassiana* (AS4B, AS1B y AS4A) presentaron niveles de patogenicidad efectivas durante todo el ensayo, esto a pesar de que la mayoría de especies de *B. bassiana* presentan un buen

desempeño a bajas temperaturas, mientras que *Metarhizium* tiene un óptimo desarrollo a altas temperaturas (Inglis *et al.*, 1997). La mayor velocidad de desarrollo de los hongos entomopatógenos oscila entre las temperaturas de 20° a 28°C. (Ortíz-Catón *et al.*, 2011). En el caso de *B. bassiana* requiere una humedad relativa superior a 60% para una mayor esporulación (Godoy *et al.*, 2007) pero su uso estaría restringido a ciertas épocas donde existe una baja presencia de humedad y la temperatura sobrepasa los 30°C (García *et al.*, 2011). Mientras que *Metarhizium* garantiza ser efectivo debido a que sin importar las condiciones del medio se hace presente y completa su ciclo con poca humedad relativa y en temperaturas de 20-40°C (García *et al.*, 2011), liberando esporas bajo condiciones de poca humedad, debido a que puede obtener la nutrición de los lípidos en la cutícula de los organismos en la que entra en contacto (Navarro y Urbina, 2015).

Por lo tanto; estas características propias de los hongos entomopatógenos se puede utilizar como una alternativa de control biológico y sostenible. Tal es el caso para *Beauveria bassiana*, que se ha demostrado ser económica y biológicamente efectiva para controlar insectos en diferentes cultivos. (Benavides *et al.*, 2012). Actualmente el uso de estos microorganismos se ha ampliado mediante bioformulados para aplicaciones en campo reduciendo considerablemente el nivel de daño de *Premnotrypes vorax* (Sandoval *et al.*, 2018; Rivera y Pinto, 2001). Sin embargo, la aplicación debe realizarse conjuntamente con prácticas de manejo integrado de otras plagas y enfermedades (Villamil *et al.*, 2016), mediante un control legal (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2011) y un control químico en época más adecuadas de manera racional y basado en estudios de compatibilidad In vitro con *Beauveria* spp. (Torres *et al.*, 2004 y Díaz, 2013).

Las cepas de *Metarhizium* sp., presentaron mortalidades altas (superior al 90%). Estas características propias les confiere propiedades patogénicas para combatir esta plaga, ya que el comportamiento y la estructura de sus células que modifican la pared celular, resultan ser altamente virulentas (Monzón, 2001). Además, especies de este género producen toxinas llamadas destruxinas que están relacionadas con la virulencia debido a que inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos (Monzón, 2001). Las destruxinas son capaces de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de Malpighi (Quiot *et al.*, 1985). Por estas razones, se puede afirmar que los hongos entomopatógenos poseen un conjunto de mecanismos que pueden superar a las defensas del hospedero.

## VI. CONCLUSIONES

Basado en los análisis morfológicos, los reportes de la distribución y el análisis molecular, temporalmente estos especímenes serán identificados como “*Premnotrypes vorax*”. Esta condición de identificación temporal podría ser corroborada con futuros secuenciamientos de *P. latithorax* y esta nueva especie (*P. vorax*) mediante colectas de sus localidades tipos.

El análisis morfológico para los hongos entomopatógenos nos ha permitido clasificar a siete cepas agrupados en dos géneros: *Beauveria* y *Metarhizium*. Sin embargo, mediante la extracción, amplificación y secuenciamiento de ADN, se determinó que: cinco cepas pertenecen a *Beauveria bassiana* y dos para *Metarhizium* sp.

Todas las cepas identificadas como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp., resultaron ser patogénicas sobre adultos de *P. vorax*. Resultando ser más efectivas las cepas AS5A, AS5B y AS4B (T6, T7 y T8) aisladas de hospederos de coleópteros. Su uso podría resultar ser la mejor alternativa para implementar un manejo de control biológico de esta plaga.

El análisis molecular fue una herramienta biotecnológica determinante en la identificación de especies de hongos entomopatógenos y de *P. vorax*, en corto tiempo y a bajo costo.

## VII. RECOMENDACIONES

Las cepas de *Metarhizium* sp., (S5A y AS5B) y de *Beauveria bassiana* (AS4B) demostraron ser altamente patogénicas a nivel de laboratorio, por lo que sería conveniente realizar aplicaciones en campo para determinar su incorporación a los programas de manejo integrado de gorgojo de los Andes en los cultivos de papa en la región Amazonas.

El integumento de los insectos (constituido por quitina) ha sido empleado como fuente de nutrición para hongos especializados, por lo que se sugiere realizar estudios para obtener cepas con mayor nivel de patogenicidad y combatir plagas en cultivos de papa tales como: *Premnotrypes vorax* (gorgojo de los Andes) y *Symmetrischema tangolias* (polillas de la papa) y en el cultivo de café para el control de *Hypothenemus hampei* (broca).

El nivel de agresividad de hongos entomopatógenos está en función al tipo de muestra utilizada para su aislamiento. Por lo que estudios de evaluación de sustratos permitirán identificar cepas nativas altamente patogénicas.

Estudios de análisis molecular permitirán la identificación correcta de un número mayor de cepas entomopatógenicas, ya que un análisis morfológico no permite diferenciar adecuadamente el cripticismo inherente del fenotipo.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, J., Arévalo, E., Díaz, A., Galindo, J., Rivero, M. y Tovar, E. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena y *S. phureja*), medidas para la temporada invernal. *Produmedios, Bogotá* D.C.5-16.
- Alcázar, J. (2002). Biología del gorgojo de los Andes *Premnotrypes* spp. (Coleoptera: Curculionidae). Manual de capacitación, Fascículo I. Centro Internacional de la Papa.
- Alcázar, J., y Cisneros, F. (1999). Taxonomía y Bionómica del Complejo del Gorgojo de la Papa Andina: *Premnotrypes*. En *el Centro Internacional de la Papa, Impacto en un Mundo Cambiante: Informe del programa 1997-1998* (págs. 141-153). Lima, Perú: Apartado 1558.
- Alcázar, J. (1997). *Producción de Tubérculos-semillas de Papa. Manual de Capacitación*. Lima.
- Alves, S. (1998). Control microbiano de insectos. Brazil: *Piracicaba*. 289-743pp.
- Barriga, E., Landázuri, P., Gallegos, P., y Williams, R. (2002). Evaluación en Laboratorio de la Patogenicidad de aislamientos nativos de *Beauveria* sp y *Metarhizium anisopliae* para el control de *Premnotrypes vorax*. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 13, 104-111.
- Barajas-Ontiveros C. G., Morales-Romano, E. M. Del Pozo-Nuñez, M. L. Rodríguez-Aguilar y J. J. Núñez-López. (2009). Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(1): 33-38.
- Barnett, H. y Hunter, B. (1998). *Ilustre general de hongos imperfectos. La Sociedad Americana de Fitopatología, Minnesota*, 217p.
- Benavides, P., Góngora, C.; Bustillo, A. (2012). Programa de MIP para controlar el barrenador de la baya del café *Hypothenemus hampei*, con énfasis en cepas mixtas altamente patógenas de *Beauveria bassiana*, para superar la resistencia a los insecticidas en Colombia. INTECH. *Open Access Publisher*. 512-540.
- Cabello, G. M; Torres, G. M y Barranco, V. P (1997). *Plagas de los cultivos: Guía de identificación*. Almería. *Manuales*.
- Campo-Martínez A., Acosta-Sánchez R. L., Morales-Velasco S., y Alonso-Prado F. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de

- acelga en la Meseta de Popayán. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 79-87.
- Carrasco, F. (1961). Sistemática y Biología del Gorgojo de los Andes *Premnotrypes latitorax* Pierce 1914 (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Peruana de Entomología*, 4(1), 30-42.
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima - Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Carrillo-Rayas, M., y Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, 19(2), 40-49.
- Cisneros, F. H. (2010). *Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en el cultivo de Papa (Solanum Tuberosum)*. Lima - Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Díaz, G. (2013). Control al gusano blanco de la papa. Boletín Técnico Informativo. En: Información Agrícola. En: <http://www.prensa.bayerandina.com/El-Agro>; consulta: mayo, 2015.
- Espitia, E. (2010). Manejo integrado de las plagas del cultivo de papa. pp. 1-132. En: Memorias Simposio Nacional de Actualización en el Cultivo de Papa *Solanum tuberosum* L. Tunja, Colombia.
- Fajardo J. (2016). Descripción etológica del gusano blanco del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) de variedad súper chola, en el Laboratorio CEASA, sector Salache, Provincia de Cotopaxi período 2015". [Tesis de grado]. Cotopaxi – Latacunga. Universidad Técnica de Cotopaxi. *Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales*.
- Felsenstein J. (1985). Límites de confianza en las filogenias: un enfoque mediante el uso de bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- France, A., M. Gerding, A. Sandoval, S. Espinosa y E. Vivanco. (1999). Patología de Insectos. Serie Quilamapu N° 122. Ed. INIA Quilamapu, Chillán, Chile. 119p.
- García, M. A., Cappello G. S., Leshner G. J. M., Molina M. F. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(1), 21-28.
- García, M. X., Villamizar, L. F., Torres, L. A., y Cotes, A. M. (2006). Efecto de subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, Costa Rica* 77: 50-56.

GBIF y EOL (s.f). Catálogo de vida. *Índice Internacional de nombre de plantas* –  
*página de inicio*. Recuperado de:

[http://gni.globalnames.org/data\\_sources/1?search\\_term=Metarhizium&commit=Search](http://gni.globalnames.org/data_sources/1?search_term=Metarhizium&commit=Search)

- Godoy, J. C.; Valera, R. E.; Guédez, C.; Cañizalez, L. M.; Castillo, C. E. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *B. bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(3): 415-425.
- Hernández-Velázquez, V. M., Z. Cervantes Espíndola, F. J. Villalobos; L. L. García & G. Peña Chora (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27(3): 591-599.
- ICA (Instituto Colombiano Agropecuario [Bogotá-Colombia] 2011). Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena y *S. phureja*) medidas en la temporada invernal. *Produmedios*.
- Inglis, G. D., Johnson, D. L., Cheng, K. J., y Goettel, M. S. (1997). Uso de combinaciones de patógenos para superar las limitaciones de temperatura en los hifomicetos entomopatógenos frente a los saltamontes. *Control Biológico*, 8(2), 143-152.
- Kumar, S., Stecher G. y Tamura K. (2016). MEGA7: Análisis de Genética Evolutiva Molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. *Biología Molecular y Evolución*. 33: 1870-1874.
- Kuschel, G. (1956). Revisión de los Premnotrypini y adiciones a los Bagoini (Aporte 17 sobre Coleoptera: Curculionoidea). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Santiago) (Contribuciones Entomológicas)*, 26(6), 187-235.
- Marvaldi, A., Del Río, M., Pereyra, V., Rocamundi, N., y Lanteri, A. (2018). Un Enfoque Molecular y Morfológico Combinado para Explorar la Filogenia Superior de los Gorgojos de Entiminae (Coleoptera: Curculionidae), con Referencia Especial a los Taxones de América del Sur. *Diversity*, 10(3), 95.
- Marvaldi1, A., y Lanteri, A. (2005). Clave para los taxones más altos de gorgojos sudamericanos basados en personajes adultos (Coleoptera, Curculionoidea). *Revista Chilena de Historia Natural*. 78: 65-87.
- MINAGRI. (Ministerio de Agricultura y Riego). "PAPA: Características de la producción nacional y de la comercialización en Lima Metropolitana". Lima-Perú 2017.



- MINAGRI. (Ministerio de Agricultura y Riego). "PAPA: Producción nacional. Lima-Perú 2018.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas. (Costa Rica)*, 63: 95-103.
- Nei, M., y Kumar, S., (2000). Evolución Filogenética y Molecular. *Oxford University Press, New York*
- Navarro, C., Josías, I., y Urbina Rodríguez, K. R. (2015). Aislamiento y caracterización microbiológica del *Metarhizium anisopliae* utilizado como una alternativa ecológica para el control de plagas agrícolas. *Disertación Doctoral, Universidad de El Salvador*.
- Ortíz-Catón, M., Alatorre-Rosas, R., Valdivia-Bernal, R., Ortiz-Catón, A., Medina-Torres, R., y Alejo-Santiago, G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Revista de Biociencias*. 1: 42-53.
- Panchi, N.; Taipe, A.; Yumisaca, F.; Pallo, E.; Montesdeoca, F.; Espinoza, S.; Andrade Piedra, J.L. (2011). Enfermedades y plagas que afectan la calidad de la semilla de papa y efecto de la selección positiva. In: Andrade Piedra, J.; Reinoso, J.; Ayala, S. (eds). Memorias. 4. Congreso Ecuatoriano de la Papa. Guaranda (Ecuador) 28-30 jun 2011. Guaranda (Ecuador).
- Pari, J. G. Z., Mamani, F. E., Rojas, P. V., y Landaeta, J. C. Z. (2016). Evaluación de sustratos y producción de *Beauveria brongniartii* (sacc.) petch para control de gorgojo de los andes (*Premnotrypes* spp) en cultivo de papa. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 17(3), 347-354.
- Peña, V. L. A., Chamorro, Y., Huertas, M., y Enríquez Insuasty, J. (2000). Hongos entomopatógenos para el manejo del gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) de la papa. *Boletín Técnico-Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Colombia)*. N°15.
- Pérez, R., Garza, J., y Argüelles-Cárdenas, J. (2009). Método de cría en laboratorio del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 16-23.
- Pierce, W. D. (1914). New potato weevils from Andean South America. *Journal of Agricultural Research*, 1(4), 347-352.
- Quiot, J. M., Vey, A., y Vago, C. (1985). Efecto de micotoxinas en células *in vitro* de invertebrados. Elsevier. *In Advances in cell culture*. 4: 199-212.

- Resh, V. H. y Carde, R. T. (2009). *Enciclopedia de insectos*. China. Copyright, Elsevier.
- Rivera, G., y Pinto, L. (2009). Evaluación de patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(2), 1-13.
- Roe, A. D., Rice, A. V., Bromilow, S. E., Cooke, J. E., y Sperling, F. A. (2010). Identificación de especies multilocus y códigos de barras de ADN fúngicos: conocimientos de simbioses de hongos de la mancha azul del escarabajo del pino de montaña. *Recursos de Ecología Molecular*, 10(6), 946-959.
- Sandoval, N. S., Lindao Córdova, V. A., Echeverría Guadalupe, M. M., Manzano Ocaña, J. C., & Inca Chunata, N. M. (2018). Patogenicidad de hongos entomopatógenos en el gorgojo de los Andes (*Premnotrypes vorax* Hustache) de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en la provincia de Chimborazo, Ecuador. *Revista Científica Europea*, 14(27), 1857-7881.
- Seifert, K. A., Samson, R. A., Houbraken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J. M., Louis-Seize, G., y Hebert, P. D. (2007). Perspectivas para la identificación de hongos utilizando códigos de barras de ADN COI, con *Penicillium* como caso de prueba. *Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias*, 104(10), 3901-3906.
- Saitou N. and Nei M. (1987). El método de unión de vecinos: un nuevo método para reconstruir árboles filogenéticos. *Biología Molecular y Evolución* 4:406-425.
- Short, D. P., O'Donnell, K., Thrane, U., Nielsen, K. F., Zhang, N., Juba, J. H., & Geiser, D. M. (2013). Relaciones filogenéticas entre los miembros del complejo de especies *Fusarium solani* en infecciones humanas y las descripciones de *F. keratoplasticum* sp. nov. y *F. petroliphilum* stat. nov. *Genética y Biología Fúngica*. 53: 59-70.
- Torres Torres, L., Espinel Correal, C., Villamizar Rivero, L. F., Gómez Álvarez, M. I., Zuluaga Mogollón, M. V., López Gil, J., ... & López Ávila, A. (2004). *Desarrollo de un insecticida microbiano para el control biológico del gusano blanco de la papa* (No. Doc. 22812) CO-BAC, Bogotá).
- Villamil C, Jorge Enrique & Martínez O, John Wilson (2014). Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria* spp., sobre *Tecia Solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) *in vitro*. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 31(1), 92-105.
- Villamil C, Jorge Enrique; Martínez O, John Wilson y Pinzón, Elberth Hernando. (2016). Actividad entomopatógena de aislamientos autóctonos de *Beauveria* spp. Sobre *Premnotrypes vorax*. *Temas agrarios*, 20(1), 1-15.

- Wille J. (1952). Entomología Agrícola del Perú. Estación Agrícola del Perú. Estación Agrícola de la Molina. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. 543 pp.
- Wibmer, G. J. y C. W. O'Brien. (1986). Lista de verificación anotada de los gorgojos (Curculionidae sensu lato) de América del Sur (Coleoptera: Curculionoidea). *Memorias del Instituto Americano de Entomología*. 39: 1-563.
- Yanggen, D.; Crissman, C.; Espinosa, P. (2003). Los plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador. Primera edición. Abya Yala, Quito. 199p.
- Zimmermann, G. (1986). El método de cebo "Galleria" para la detección de hongos entomopatógenos en el suelo. *Revista de Entomología Aplicada*. (102) 21.