

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE DOS CEPAS DE
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADAS Y DOS CEPAS COMERCIALES DE
BEAUVERIA SP Y *METARHIZIUM SP*, EN LARVAS DE *TECIA SOLANIVORA*

ANGELICA LORENA GONZALEZ CORTES
ANGIE PAOLA MIRANDA ORTIZ

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTA D.C.
2017

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE DOS CEPAS DE
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADAS Y DOS CEPAS COMERCIALES DE
BEAUVERIA SP Y *METARHIZIUM SP*, EN LARVAS DE *TECIA SOLANIVORA*

ANGELICA LORENA GONZALEZ CORTES
ANGIE PAOLA MIRANDA ORTIZ

PROYECTO DE GRADO

DIRECTOR: FRANCOIS HERRERA JACQUELIN,
BIÓLOGO, M.SC. ECOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.

2017

Agradecimientos

El presente trabajo de grado ha sido realizado bajo la dirección del Biólogo François Herrera, a quien queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento por hacer posible la realización de este proyecto. Además agradecer por su indispensable apoyo, paciencia y dedicación que tuvo para que todo saliera de manera exitosa.

Al Microbiólogo Rafael Barragán y al Ingeniero Johan Álvarez les queremos agradecer por brindarnos su colaboración, por su tiempo y compartir sus conocimientos, les damos un agradecimiento especial por ser parte esencial en la ejecución de este proyecto.

A nuestros padres, por su indiscutible apoyo durante nuestra educación universitaria, por depositar en nosotras su confianza, por ser el núcleo principal para conseguir que este sueño se hiciera realidad y por ser un ejemplo a seguir.

A nuestras familias, por motivarnos a cumplir este sueño y animarnos siempre sin importar que tan lejos estén.

A nuestros amigos y parejas, por ser parte fundamental en nuestras vidas, motivarnos en los momentos tristes y disfrutar de momentos alegres. Miguel Ramírez, Mateo Rojas, Laura Gonzalez y Jorge Torres.

A nuestros maestros, quienes compartieron sus conocimientos y nos acompañaron durante toda nuestra formación profesional.

A Laboratorios CORPOICA sede Tibaitatá, que junto con la ayuda y colaboración de Jhon Gallo y Stephanie Numa Vergel nos brindaron las crías necesarias de *Tecia solanivora* para el desarrollo de nuestro trabajo.

Gracias.

Resumen

En el presente trabajo de investigación se realizó un estudio para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de dos cepas de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* sp y dos del género *Metarhizium* sp sobre larvas de tercer instar de *Tecia solanivora*. Para cada género se evaluó una cepa comercial y una aislada en el laboratorio de la USTA. En la primera fase de la investigación se probaron las metodologías de aplicación de las conidias de los hongos entomopatógenos, con y sin tensoactivo (tween 80) y por aspersión o inmersión usando como organismo blanco larvas de tercer instar de *Galleria mellonella*, se determinó que el mejor método de infección es la inmersión con el uso de un tensoactivo. A partir de este método de infección se realizaron los bioensayos sobre las larvas de tercer instar de *Tecia solanivora* en las que se evaluaron para las cuatro cepas, concentraciones que oscilaron entre los ordenes de 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶. Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre las cepas y las concentraciones evaluadas. Las cepas comerciales de *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp obtuvieron mayor respuesta en cuanto al porcentaje de mortalidad debido a que presentaron una menor CL₅₀ a los 8 días de haber iniciado el ensayo con respecto a las cepas aisladas en la USTA. La cepa más patogénica fue *Metarhizium* sp comercial con un valor de CL₅₀₋₉₆ de 6x10² conidias/ml.

Palabras clave: *Beauveria* sp, concentración letal media, control biológico, eficiencia, *Metarhizium* sp, *Tecia solanivora*.

Abstract

In the present study, a study was carried out to determine the average lethal concentration (CL₅₀) of two types of entomopathogenic fungi: *Beauveria* sp and *Metarhizium* sp, in which two strains isolated in the laboratory of the USTA and two commercial strains will be taken into account, as a relative witness, for pest control of the Guatemalan moth. In the first phase of the investigation, the methodologies for the application of conidia of entomopathogenic fungi were tested, with and without surfactant (tween 80) and by spraying or immersion using as a white organism third instar larvae of *Galleria mellonella*, so it was determined that the best method of infection is immersion with the use of a surfactant. Based on this method of infection, bioassays were carried out on the third instar larvae of *Tecia solanivora* evaluated for the four strains, concentrations that ranged between the orders of 10³, 10⁴, 10⁵ and 10⁶. Statistically significant differences were found between the strains and the concentrations evaluated. The commercial strains of *Beauveria* sp and *Metarhizium* sp obtained the highest response in terms of the percentage of mortality due to the fact that they presented a lower LC₅₀ at 8 days after starting the trial with respect to strains isolated in the USTA. The most pathogenic strain was commercial *Metarhizium* sp with a CL₅₀₋₉₆ value of 6x10² conidia / ml.

Key words: average lethal concentration (CL₅₀), *Beauveria* sp, biological control, efficiency, *Metarhizium* sp, *Tecia solanivora*.

Contenido

Resumen	II
Abstract.....	III
Lista de tablas	VI
Lista de gráficas	VII
Lista de imágenes	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de ecuaciones	X
Lista de símbolos y abreviaturas	XI
1. Introducción.....	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general.	3
2.2. Objetivos específicos.	3
3. Marco teórico	4
3.1. Importancia del cultivo de la papa.....	4
3.2. <i>Tecia solanivora</i>	5
3.3. Control tradicional de la polilla de la papa.....	7
3.4. Control biológico de plagas	8
3.5. Hongos entomopatógenos.	9
3.6. <i>Beauveria</i> sp.	11
3.7. <i>Metarhizium</i> sp.	12
3.8. <i>Galleria mellonella</i>	13
3.9. Control biológico de <i>Tecia solanivora</i>	14
3.10. Método estadístico Probit para la determinación de la concentración letal media.	15
4. Metodología	16
4.1. Producción de conidias de los hongos entomopatógenos.	16
4.2. Cría de <i>Tecia solanivora</i>	17
4.3. Cría de <i>Galleria mellonella</i>	18
4.4. Ensayos preliminares para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos	19
4.5. Ensayos para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos	19
4.6. Ensayos para determinar la CL50 de las cepas evaluadas.....	23

5. Resultados y discusión.....	25
5.1. Confirmación de la taxonomía de los hongos de estudio.	25
5.2. Cría de la <i>Galleria mellonella</i>	26
5.3. Cría de <i>Tecia solanivora</i>	28
5.4. Ensayos preliminares para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos	30
5.5. Determinación del mejor método de infección de los hongos entomopatógenos.	30
5.6. Determinación de la CL_{50} de los hongos entomopatógenos sobre la <i>Tecia solanivora</i>	37
6. Impacto social y ambiental:	44
7. Conclusiones.....	45
8. Recomendaciones	47
9. Bibliografía	48
A. Anexo: memoria de cálculo para la determinación del método de infección.	55
B. Anexo: registro de las pruebas sobre <i>Galleria mellonella</i>	57
C. Anexo: resultados estadísticos para la determinación del método de infección.	60
D. Anexo: memoria de cálculo de las pruebas sobre <i>Tecia solanivora</i>	81
E. Anexo: registro pruebas sobre <i>Tecia solanivora</i>	83
F. Anexo: resultados estadísticos para la determinación de la cl_{50}	85
G. Anexo: memoria de cálculo de la cl_{50} por medio del uso del software PROSTAT.	102

Lista de tablas

Tabla 1. Costos de venta de los ingredientes activos de los insecticidas.....	08
Tabla 2. Tratamientos del ensayo preliminar.....	19
Tabla 3. Registro del número de individuos muertos del ensayo preliminar.....	30
Tabla 4. Tratamientos para el método de infección.....	31
Tabla 5. Concentraciones para los ensayos del método de infección.....	32
Tabla 6. Tratamientos para determinar la CL50 de los hongos entomopatógenos.....	37
Tabla 7. Concentración letal 50 para cada hongo entomopatógeno evaluado..	43

Lista de gráficas

Gráfica 1. Tratamientos de inmersión para las cuatro cepas de estudio sin tensoactivo.....	33
Gráfica 2. Tratamientos de inmersión para las cuatro cepas de estudio con tensoactivo.....	33
Gráfica 3. Tratamientos de aspersión para las cuatro cepas de estudio sin tensoactiv.....	34
Gráfica 4. Tratamientos de aspersión para las cuatro cepas de estudio con tensoactivo.....	35
Gráfica 5. Porcentaje de mortalidad al octavo día de los tratamientos evaluados para determinar el método de infección.....	36
Gráfica 6. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de Beauveria sp aislada.....	38
Gráfica 7. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de Beauveria sp comercial.....	39
Gráfica 8. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de Beauveria sp aislada.....	40
Gráfica 9. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de Meatarhizium sp comercial.....	40
Gráfica 10. Porcentaje de mortalidad al octavo día de los tratamientos evaluados para CL ₅₀	42

Lista de imágenes

Imagen 1. Beauveria sp.....	11
Imagen 2. Metarhizium sp.....	13
Imagen 3. Vista desde el microscopio de la retícula cuadrangular de la cámara de Neubauer.....	20
Imagen 4. Retícula cuadrangular de la cámara de Neubauer.....	20
Imagen 5. Esquema de los tratamientos para la determinación del método de infección.....	22
Imagen 6. Esquema de los tratamientos para la determinación de la concentración letal media.....	24
Imagen 7. Registro fotográfico para la determinación de los hongos entomopatógenos.....	25
Imagen 8. Ciclo de vida de la Galleria mellonela - Estado de pupa y adulto.....	26
Imagen 9. Ciclo de vida de la Galleria mellonela - Estado de huevo.....	27
Imagen 10. Ciclo de vida de la Galleria mellonela - Estado de larva.....	27
Imagen 11. Ciclo de vida de la Tecia solanivora - estado de huevo.....	28
Imagen 12. Ciclo de vida de la Tecia solanivora - estado de larva y pupa.....	28
Imagen 13. Ciclo de vida de la Tecia solanivora - estado de pupa y adulto.....	29
Imagen 14. Sistema de recolección de huevos.....	29

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo para la producción de conidias.....	17
Figura B 1. Registro de mortalidad.....	58
Figura C 1. Áreas bajo la curva.....	61
Figura C 2. ANOVA de un factor.....	61
Figura C 3. Estadísticos descriptivos.....	62
Figura C 4. Significancia de los datos.....	63
Figura C 5. Comparaciones múltiples.....	64
Figura C 6. Subconjuntos homogéneos.....	79
Figura E 1. Registro mortalidad pruebas sobre Tecia solanivora.....	84
Figura F 1. Áreas bajo la curva de las pruebas sobre Tecia solanivora.....	86
Figura F 2. ANOVA de un factor (Tecia solanivora).....	87
Figura F 3. Estadísticos descriptivos (Tecia solanivora).....	88
Figura F 4. Prueba de homogeneidad de varianzas (Tecia solanivora).....	89
Figura F 5. Significancia de los datos (Tecia solanivora).....	89
Figura F 6. Comparaciones múltiples (Tecia solanivora).....	89
Figura F 7. Subconjuntos homogéneos (Tecia solanivora).....	100

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Determinación de la concentración de conidias.....	20
--	----

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas	Términos
ANOVA	Analysis of Variance
BHC	beta-Hexachlorocyclohexane
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
FONTAGRO	Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
PDA	Potato Dextrosa Agar
sp	Especie
SPSS	Statistical Package for the Social Science
TEPP	Tetraethyl pyrophosphate
USTA	Universidad Santo Tomas

Símbolos	Términos
°C	Grado centígrado
%	Porcentaje
±	Más o menos
cm ³	Centímetro cúbico
kg	Kilogramo
m ³	Metro cúbico
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro

1.Introducción

Desde finales de los años 50's a los años 80's se gestó el movimiento denominado la revolución verde, que tenía como fin, el incremento de productividad agrícola, a partir de la tecnificación basada en cultivares mejorados, la mecanización, los subsidios energéticos y el uso indiscriminado de agroquímicos. Es a partir de este evento que se iniciaron diversas problemáticas ambientales derivadas del uso de plaguicidas; como por ejemplo, la resistencia que los insectos y otros organismos adquirieron ante estas sustancias por su aplicación continua generando un incremento en la dosis a aplicar, ocasionando un aumento en la contaminación del aire, el suelo y el agua; y así la eliminación de enemigos naturales ya que dichos agroquímicos no eran productos selectivos, lo cual provocó el envenenamiento de aves y peces, y la reducción en la población de abejas [1]. Por otro lado, se demostró el riesgo de la permanencia por un periodo prolongado dentro de la red trófica de algunos pesticidas como los organoclorados, los cuales tienden a bioacumularse alcanzando la concentración letal media para otros organismos presentes en el medio, además de generar problemas de fertilidad en el medio biótico, genera problemas al ser humano al llegar con una concentración más alta [2].

En Colombia, especialmente en la zona fría Andina, el cultivo de papa constituye una de las principales actividades económicas del sector agrícola, representando en promedio un 32% de la producción de cultivos transitorios, dentro del cual se centra un 90% en las variedades Diacol Capiro, Parda Pastusa, Pastusa Suprema y Tuquerreña [3], todas estas variedades son vulnerables a la plaga *Tecia solanivora* que se le conoce también como polilla gigante, palomilla grande, polilla centroamericana y principalmente como polilla guatemalteca. Este es un insecto de la familia *Gelechiidae* cuyas larvas atacan los tubérculos, generando galerías que afectan su aspecto general y pueden facilitar pudriciones por organismos saprófitos. La plaga llega a Colombia en 1985 convirtiéndose en un problema grave en la zona papera por su poca rotación y la falta de establecer un manejo apropiado de la misma, iniciando en los departamentos de Santander y Norte de Santander, donde las pérdidas ocasionadas en campo y almacén superaron el 50% [4,5]

Para el año 2014 los departamentos de Boyacá (27%), Cundinamarca (38,5%) y Nariño (19,4%), generaron los mayores porcentajes de producción de papa en Colombia con respecto a una producción total de 2.490.000 toneladas, por lo mismo este cultivo agrícola genera una mayor demanda de insecticidas gastando alrededor de 107 mil millones de pesos, teniendo en cuenta que la plaga puede causar infestaciones del 90% en el cultivo con pérdidas en la producción del 25% y en almacenamiento hasta del 100% [6].

La presente investigación es la continuación de un trabajo desarrollado en la USTA en donde en un proceso de prospección biológica en Cundinamarca se aislaron siete cepas de hongos de las cuales dos mostraron un potencial biológico para el control de larvas de *Tecia solanivora* [7]. Por lo tanto en esta fase de la investigación se tiene como objeto determinar la concentración letal media de estas dos cepas de hongos entomopatógenos que pertenecen a los géneros *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp con el fin de contribuir al desarrollo de una tecnología que busca desarrollar un insecticida biológico que pueda ser utilizado como alternativa a los insecticidas químicos y así evitar sus perjuicios al ambiente. Además, por medio de esta investigación se pretende determinar la eficacia de las cepas aislada en comparación con cepas comerciales de los mismos géneros.

2.Objetivos

2.1. Objetivo general.

Determinar la concentración letal media de dos cepas de hongos entomopatógenos de *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp aisladas en los laboratorios de la Universidad Santo Tomás sobre larvas de *Tecia solanivora*.

2.2. Objetivos específicos.

- Aislar las conidias de los hongos entomopatógenos para el montaje de los bioensayos y su posterior reproducción.
- Establecer la mejor metodología de aplicación de las conidias de los hongos entomopatógenos sobre larvas de *Galleria mellonella*.
- Reproducir la *Tecia solanivora* y *Galleria mellonella* para obtener larvas y así realizar el montaje de los bioensayos.
- Comparar la eficiencia de los patógenos evaluados en cuanto a su CL₅₀ entre las cepas aisladas en la USTA y cepas comerciales.
- Contribuir al estudio de patógenos de insectos plaga que tienen potencial para el desarrollo de tecnologías biológicas alternativas al uso de insecticidas químicos

3.Marco teórico

3.1. Importancia del cultivo de la papa

La papa (*Solanum tuberosum*) es una herbácea anual que alcanza un metro de altura y produce un tubérculo como reserva de almidón, pertenece a la familia de las solanáceas. El género *Solanum*, tiene más de 4.000 especies de las cuales dos especies producen tubérculos comestibles: *S. tuberosum* y *S. phureja* (papa criolla), se encuentra en una temperatura promedio de 10 a 30 °C sin embargo, su temperatura óptima es entre 18 a 20 °C [2].

Las hojas compuestas de esta planta que producen almidón, se desplaza hacia la parte final de los tallos subterráneos (estolones), los cuales se engrosan produciendo así hasta 20 tubérculos cerca del exterior dependiendo de la humedad y los nutrientes que tenga el suelo. Al terminar el periodo de crecimiento, los tallos y las hojas de la planta se marchitan desprendiendo los estolones, estos sirven de nutrientes que ayuda a la planta a reverdecer y reproducirse [8].

Una papa media, de 150 gramos, consumida con su piel, aporta casi la mitad de las necesidades diarias del adulto (100 mg), adicionalmente fomenta la absorción principalmente de vitamina C, B1, B3 y B6, y otros minerales como potasio, fósforo y magnesio, así como folato, ácido pantoténico y riboflavina. También contiene antioxidantes alimentarios, los cuales pueden contribuir a prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y tiene fibra, cuyo consumo es bueno para la salud, es por esto que se posiciona como el cuarto alimento de mayor consumo a nivel mundial después del arroz, trigo y maíz [9].

La producción estimada a nivel mundial es de 320 millones de toneladas por año, esta se cultiva en más de 100 países a diferentes; En Colombia, la papa es el eje fundamental de la economía local de 283 municipios Colombianos de los cuales se centra un 90% de su producción total en Boyacá, Nariño y Cundinamarca [10]; las variedades más cultivadas son la tuquerreña o sabanera, parda pastusa, pastusa suprema, rubí, salentina, carriza, diacol capiro-r12, ICA única, ICA nevada, ICA Nariño, milenio-1, diacol Monserrate y yema de huevo (papa criolla). Las etapas del proceso productivo que se desarrollan en Colombia para el cultivo de la papa, se son la selección y clasificación de la semilla, el establecimiento del cultivo, desarrollo del cultivo, la sanidad del cultivo, la cosecha y la pos cosecha [3].

En el país existen unas 90.000 familias que se dedican al cultivo de la papa generándose en él, a su vez, alrededor de 20 millones de jornales al año; los productores se clasifican en pequeños, medianos y grandes, de los cuales se considera como pequeños a productores con menos de 3 hectáreas, medianos entre 3 a 10 hectáreas y los grandes cuentan con más de 10 hectáreas, sin embargo casi toda la producción está centrada en los pequeños productores con

un 85%, mientras que los medianos y grandes productores cuentan con el 10% y 5% respectivamente de la producción total del país [10].

El cultivo de papa se considera transitorio sin embargo, se cuenta con un área de siembra aproximada de 160.000 hectáreas valoradas en 500 millones de dólares por año en Colombia, teniendo en cuenta que este es el cultivo que mayor demanda hace en el país de fungicidas e insecticidas y el segundo de fertilizantes químicos después del café. Constituye asimismo la actividad que más servicios de transporte terrestre demanda con más de dos millones de toneladas al año, sumado esto a la movilización de los insumos que se utilizan en su producción [11].

Se ha de considerar que el cultivo de la papa, especialmente el tubérculo es afectado principalmente por seis plagas que logran altos niveles de pudrición las cuales son: Gusano Blanco de la papa (*Premnotypes vorax*), Polilla Guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*), Tiroteador (*Naupactus sp*), Palomilla (*Phthorimaea operculella*), Chisa (*Ancognatha*) y Babosa (*Milax gagates*) [12]; generalmente se cuenta con un Manejo Integral de Plagas (MIP) el cual consiste en la determinación del nivel de población, eliminación de las fuentes de infestación, trampeo, uso de semillas certificadas, cosecha oportuna, control químico y tratamiento de semillas (almacenamiento) [13].

3.2. Tecia solanivora

La polilla guatemalteca de la papa o *Tecia Solanivora* es una plaga de gran impacto sobre el cultivo de la papa, especialmente por daño directo sobre los tubérculos; esta polilla de la familia Gelechiidae y de orden lepidoptera fue descrita por primera vez en Guatemala, se ha extendido a otros países como Venezuela (1983), Ecuador (1996) y Colombia (1985). En España causó un alto impacto inicialmente en las Islas Canarias, cerca del año 1999 en donde se evidenciaron pérdidas en algunos de sus terrenos, especialmente en las zonas más secas, que se situaron entre el 30 y el 50% de la cosecha; este problema ha sido combatido por la Administración Pública de la comunidad Autónoma de Canarias a los Cabildos Insulares [14]. Actualmente se detectó por primera vez en España continental en septiembre de 2015, específicamente en la provincia de La Coruña (Galicia) Posteriormente se ha detectado en la provincia de Lugo y en el Principado de Asturias [15].

Esta polilla holometábola, es decir, que comprende cuatro estados de desarrollo, el huevo, la larva, la pupa y el adulto; para el desarrollo de cada una de las etapas es indispensable ciertas condiciones de temperatura y humedad relativas por lo que dependiendo de dichas condiciones la duración del ciclo de vida será entre 65 a 93 días [16].

El periodo de actividad diaria de la polilla guatemalteca es durante el atardecer, la noche y el amanecer, esto es debido a su sensibilidad a la luz solar, por lo que de

día permanecen en sitios oscuros y frescos. La proporción entre los sexos es de 1:1, las hembras producen una feromona que atrae a los machos para la cópula, esta atracción ocurre inmediatamente después del nacimiento del adulto, estas pueden ovipositar durante 10 días fecundando entre 150 y 360 huevos [17].

La forma de los huevos es ovalada, miden aproximadamente 0,5 milímetros de diámetro y son color blanco aperlado; al momento de la eclosión su color es amarillo intenso con un oscuro en el lado donde va a eclosionar. En papa almacenada bien sea para consumo o para semilla, la polilla deposita los huevos sobre el tubérculo, y en campo muy cerca de la zona de tuberización¹, dando paso así a las larvas después de 8 a 10 días de la postura [16].

Las larvas nacen con una longitud aproximada de 1 milímetro; estas pasan por cuatro instares o estadios intermedios, inicialmente presentan una forma alargada constituida por tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas abdominales y un par de pseudopatas anales, en este punto miden aproximadamente 1,3 milímetros y posteriormente llegarán a medir hasta 14 milímetros. El color inicial de las larvas es blancuzco, durante su desarrollo se presenta un viraje hacia una coloración amarillo verdoso, finalizado el mismo su color de dorso se torna púrpura y su color de cabeza es entonces un pardo claro; las larvas presentan pináculos² de forma trapezoidal sobre el dorso de cada segmento, además de un escudo protorácico en su primer segmento abdominal [16].

Cuando las larvas abandonan el tubérculo, forman un capullo de seda de color café rojizo que recubre con tierra manteniendo su forma, este deja de comer y pierde de movilidad, entra en un estado de prepupa durante 2 a 3 días; cuando el capullo está completamente formado entra en el estado de pupa durante un tiempo aproximado de 15 a 20 días, la pupa se va oscureciendo se evidencian diferencias de tamaño dependiendo del sexo de la polilla, si es macho puede tener un tamaño de 7,8 milímetros, por otro lado las hembras tendrán un tamaño de pupa de 8,5 milímetros de largo. Al ser un insecto del orden lepidóptero se evidencia una pupa de tipo obtect³ [17].

Los adultos presentan un dimorfismo sexual característico de los mismo, por lo que las hembras pueden llegar a medir 12 milímetros de largo por 3,4 de ancho, en cambio los machos miden aproximadamente 9,7 milímetros de largo por 2,9 de ancho; las hembras son distinguidas no solo por su tamaño sino por un abdomen abultado y de color claro, mientras que los machos son delgados y de color oscuro en su abdomen, sin embargo la forma de copa de sus alas es idéntica [17].

¹ Periodo de 10 a 14 días, en el que se inicia la formación de tubérculos en las extremidades del estolón [75]

² En larvas, área esclerotizada del tegumento planada o ligeramente elevada con 1 – 4 setas [76]

³ Caracterizada por poseer podotecas y pterotecas adheridas al cuerpo y cubiertas por un tegumento externo esclerotizado, también llamado pupa cubierta [76]

3.3. Control tradicional de la polilla de la papa

En la etapa reproductiva del cultivo de la papa se debe tener un constante monitoreo de la *Tecia solanivora* en largos periodos secos y cercanos a un foco de propagación de la plaga. En el caso de determinar la presencia por medio de observación directa de larvas, pupas o adultos, o a partir de lecturas semanales de capturas de adultos machos en trampas de feromona sexual los agricultores aplican grandes cantidades de insecticidas para su control [2]. Dependiendo del grado de infestación se aplica de 12 a 24 veces durante el periodo del cultivo, de acuerdo al sistema de alerta que maneje el cultivo frente a la tasa de reproducción de la plaga [18]. No obstante la eficacia del control químico se ve comprometido por los diversos factores que inciden como lo es el comportamiento de los insectos, las condiciones y forma de aplicación, la fase de desarrollo del cultivo, la dosis del producto y la humedad del suelo ya que si este no es muy húmedo los ingredientes activos pierden su efecto rápidamente por la volatilización y la descomposición por la luz [19]. Entre los controles químicos efectuados en el cultivo se encuentran cuatro grandes grupos en los que se dividieron en organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides [1].

Donde, los organoclorados eran usados frecuentemente para el control de insectos por su acción residual, sin embargo, esto los convierte a la vez en sustancias peligrosas por la persistencia de sus residuos en el ambiente y su prolongado almacenamiento en los tejidos adiposos de los mamíferos debido a su alto grado de liposolubilidad a través del proceso de biomagnificación en la red trófica, en este grupo se encontraron insecticidas como el DDT, BHC, clordano y dieldrin, los cuales en el transcurso del tiempo se han ido prohibiendo por su toxicidad, al atentar contra la salud humana y el ambiente [1]. Los organofosforados actúan como insecticidas de contacto y fumigantes, que al ser aplicados en el suelo las plantas lo absorben circulando por la savia haciéndola tóxica, además son más tóxicos para los vertebrados que los compuestos organoclorados, el primer insecticida organofosforado fue el TEPP siendo el producto insecticida sintético más tóxico al alcance del campesino teniendo en cuenta que su dosis letal en ratones es inferior a 1 mg/kg y la frágil estabilidad química ante la humedad provocó accidentes entre los aplicadores de plaguicidas, para el control de la polilla de la papa se utiliza el clorpirifós el cual se adhiere a las partículas del suelo y al no ser hidrosoluble se degrada por la luz solar, donde al ser inhalado produce efectos sobre el sistema nervioso [1, 20, 21].

Por otra parte, los carbamatos empezaron a aparecer en los años 60's presentando una persistencia y toxicidad media entre los organoclorados y los organofosforados, sin embargo, siguen presentando el problema de su alta toxicidad aguda haciéndolo muy peligroso para el agricultor; entre los carbamatos, el insecticida más conocido es el carbaril que para el agricultor tiene mayor probabilidad ante la exposición dérmica siendo hasta de 2,88 mg/kg luego en el aire en los que se encontraron concentraciones de 0,28 mg/m³, actuando como inhibidor de la acetilcolinesterasa en las sinapsis nerviosa [22], otro insecticida

utilizado es el carbofuran, donde su vida media en el suelo es de 30-117 días y de alta velocidad de lixiviación teniendo en cuenta que este sea arenoso, lo que hay que tener en cuenta por su alta toxicidad para peces e invertebrados acuáticos [23]. El grupo de los piretroides empezó a tener una aceptación en los 80's ante su baja toxicidad para mamíferos y baja acumulación en el ambiente, sin embargo se empezó a registrar resistencia por parte de las plagas ante este compuesto haciendo ineficiente su uso [1], algunos de los insecticidas pertenecientes a este grupo son la aletrina y el fenvalerato, permetrina, caracterizados por ser productos moderadamente peligrosos [24].

Los costos de los insecticidas usados en el cultivo de la papa de acuerdo a su ingrediente activo vienen representados en litros vendidos de cada uno como se evidencia en la Tabla 1. De acuerdo al informe que representa las estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2015 realizado por el ICA (Instituto Colombiano de Agricultura), para el cual los agricultores colombianos están gastando alrededor de \$71.102.041.828 teniendo en cuenta que este gasto no es precisamente una inversión para el control de plagas ya que por el momento no hay productos que hayan demostrado su eficiencia al 100% para el control de la *Tecia solanivora*, y únicamente son una medida complementaria a un conjunto de prácticas que permitan proteger los periodos del cultivo [25].

Tabla 1. Costos de venta de los ingredientes activos de los insecticidas [26, 27]

INGREDIENTE ACTIVO	LT		PRECIO VENTA
	Producción	Venta	
Carbofuran	102.628	126.215	\$7.212.285
Metamidofos	702.074	632.270	\$54.796.700.000
Profenofos	163.085	149.022	\$894.132.000
Malathion	149.402	148.678	\$10.397.600.000
Dimetoato	-	194.078	\$678.632.543
Diazinon	5,901	8.060	\$1.209.000.000
Deltametrina	147.246	24.650	\$1.074.715.000
Monocrotofos	134.136	136.270	\$2.044.050.000
TOTAL			\$71.102.041.828

3.4. Control biológico de plagas

Las poblaciones de organismos están reguladas por la acción natural de sus depredadores, parásitos, parasitoides, patógenos⁴ y competidores, cuando dicha regulación se rompe o pierde su equilibrio alguno de estos organismos se convierte en una plaga; generalmente, esto ocurre cuando alguna especie es transportada de un ecosistema a otro, en donde sus compañeros naturales que

⁴ Microorganismo capaz de causar enfermedad [74].

mantienen el equilibrio no se encuentran. Se hace necesario entonces, hablar de un control biológico de plagas, pues no siempre la mejor alternativa es el uso de un plaguicida; es importante resaltar que el objetivo del control biológico es, mediante el uso de enemigos naturales, reducir el impacto perjudicial de la plaga que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano, por lo que se busca restablecer los niveles de control natural auto sostenido que se dan en los ecosistemas propios de dicha plaga [28].

Según Fischbein, *“Los organismos que son utilizados comúnmente como enemigos naturales en el control biológico de invertebrados, se clasifican en cuatro categorías: parasitoides, depredadores, patógenos y competidores. Estos agentes de control provienen de una gran variedad de grupos taxonómicos, incluyendo a los insectos, ácaros, nematodos y microorganismos, tales como las bacterias, los virus, los hongos y los organismos unicelulares”* [28].

El control biológico consiste en el uso de los competidores de las plagas para el control de sus poblaciones, disminuyendo el impacto de la plaga; distinguiendo así entre la lucha microbiológica (LMB) si se utilizan microorganismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos, nematodos, etc) y la lucha macrobiológica (LB) si se utilizan depredadores artrópodos (insectos, ácaros, arañas). Por otro lado, es un método efectivo y duradero debido a que el control que ejerce los enemigos naturales ya sea de forma natural o aumentativa es barato, permanente y no interfiere negativamente con otro proceso del ecosistema [29, 30]

3.5. Hongos entomopatógenos.

La mayoría de los hongos entomopatógenos se clasifican dentro de la división *Eumycota*, que se caracteriza por no formar plasmodio o pseudoplasmodio y por presentar una fase asimilativa típicamente filamentosa. Los hongos entomopatógenos son aquellos capaces de parasitar distintos órdenes de artrópodos, la mayoría de ellos pueden invadir insectos muertos llamados saprófagos y hongos entomófagos que infectan insectos vivos provocándoles micosis [31]. Entre los grupos patógenos, está el grupo de los *Entomophthorales* el cual es reconocido por la capacidad de causar epizootias⁵ naturales con el fin de regular las poblaciones de distintas especies de insectos, donde el control por parte del patógeno puede llegar a ser permanente si el insecto-plaga está presente durante todo el año, mayor exposición al hongo cuando las hembras depositan sus huevos de manera aislada y mayor mecanismo de dispersión cada vez que las esporas son liberadas al medio favoreciendo el desarrollo de las epizootias [32].

Teniendo en cuenta que el 80% de las enfermedades en los insectos son causadas por hongos, hace que el uso de este tipo de microorganismos se emplee como alternativa para controlar los insectos-plaga, presentando ventajas por su

⁵ Enfermedad que acomete a una o varias especies de animales por una causa general o transitoria [81]

especificidad, su dispersión natural, alta capacidad de reproducción, la penetración en el hospedero, su transmisión horizontal posibilitando la infección por contacto y no solamente a través de la progenie como sucede con los virus y los protozoarios, y su baja tasa de resistencia con respecto a los agroquímicos sintéticos [32]. Los hongos entomopatógenos usados como insecticidas biológicos son caracterizados por su baja toxicidad sobre otros organismos del ambiente y por su facilidad de ser tratados industrialmente (cultivo, formulación, empaquetado, almacenamiento y comercialización) como un insecticida convencional; por consiguiente las especies principalmente utilizadas para la comercialización y control de su correspondiente enemigo natural se destacan la *Beauveria bassiana*: coleópteros. El *Verticillium lecanii*: áfidos, moscas blancas y tisanópteros. Y el *Metarhizium anisopliae*: homópteros en general [33].

El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos está formado por un proceso de hospedaje, el cual consta de cinco fases: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción; dicho proceso comienza cuando las conidias⁶ se adhieren al tegumento en donde se da inicio a la penetración al interior del cuerpo. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas después de la inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas después de la misma. El proceso de penetración se da por mecanismos físicos y químicos, la parte física la constituye la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula y la parte química consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona, lo que facilita el ingreso del hongo [34].

Después de la penetración, la hifa⁷ se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación, en este momento se genera una colonización formando pequeñas estructuras del hongo, es en esta etapa se da la enfermedad final del insecto; si bien el insecto no ha muerto, el hongo puede producir toxinas que sintetiza en su relación patógeno-hospedante. Entre sustancias se han encontrado destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, de actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos, principalmente las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular [34].

La infección por hongos entomopatógenos es dependiente de la humedad relativa y la temperatura, sin embargo existen compuestos que pueden incurrir en el fracaso del hongo, pues le afectan directamente, entre estos están los fenoles, quinonas y lípidos (generalmente se encuentran en la superficie de la cutícula). Los efectos de los hongos sobre los insectos son variados, pueden producir una

⁶ Célula formada como producto de la reproducción asexual de un hongo; sirve como vehiculó de propagación de las especies o como estructura de resistencias a las condiciones del medio ambiente. [73]

⁷ Elemento fúngico de pared gruesa y con septos [77]

disminución del movimiento, producción de espuma, falta de alimentación del insecto, reducción del vuelo, evita la oviposición, entre otros. Generalmente después de 8 a 10 días de la muerte, el cuerpo del insecto presenta un crecimiento micelial blanco y consecuentemente una esporulación, este último condicionado por la humedad en la que se encuentre, por lo que puede estar presente o ausente [34].

3.6. *Beauveria* sp.

Beauveria es el género de un hongo entomopatógeno de la clase Deuteromycetes, familia Moniliaceae, sus hifas septadas contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos⁸, sobre las cuales se desarrollan las conidias [35]. La colonias de *Beauveria* sp, crecen aproximadamente entre 0,6 a 2,3 centímetros en un tiempo de 8 días a 20°C, su color es blanco y va presentado un cambio a amarillo y posteriormente a rosado conforme la maduración (Imagen 1), dichas colonias requieren un pH entre 5,7 y 5,9 para su crecimiento. Este género, es caracterizado por la presencia de un micelio⁹ blanco, los conidióforos son sencillos y generalmente agrupados, hinchados en la base, los conidios son hialinos¹⁰ y rodeados de ovoides con un tamaño entre 3 a 6 micras de largo y 2,5 a 3,5 micras de ancho [36].

Imagen 1. *Beauveria* sp.



El método de acción de este hongo se presenta en ocho etapas: adhesión, germinación, penetración, producción de toxinas, muerte del insecto, multiplicación y crecimiento, penetración hacia el exterior y producción de nuevas unidades reproductivas [37]. Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocoele¹¹, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son

⁸ Hifa especializada en donde se forman las conidias [78]

⁹ Parte vegetativa del hongo, formado por una masa de hifas que se desarrolla sobre el sustrato [77]

¹⁰ Tipo de textura delgado transparente y sin color [77]

¹¹ Cavidad corporal en insectos [76]

nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento, sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas [38] .

El hongo *Beauveria bassiana* es considerado uno de los agentes de control biológico con mejor eficiencia en el sector agrícola, adicionalmente se ha estudiado que muchas plagas de diferentes cultivos han demostrado resistencia a productos agroquímicos y sumado a esto, los países a los cuales se exportan los productos aumentan las restricciones en el uso de numerosos plaguicidas, por lo que en este sentido los microorganismos entomopatógenos constituyen una herramienta importante para el manejo integrado de plagas en cuanto demandan productos naturales u orgánicos, con certificación [39]

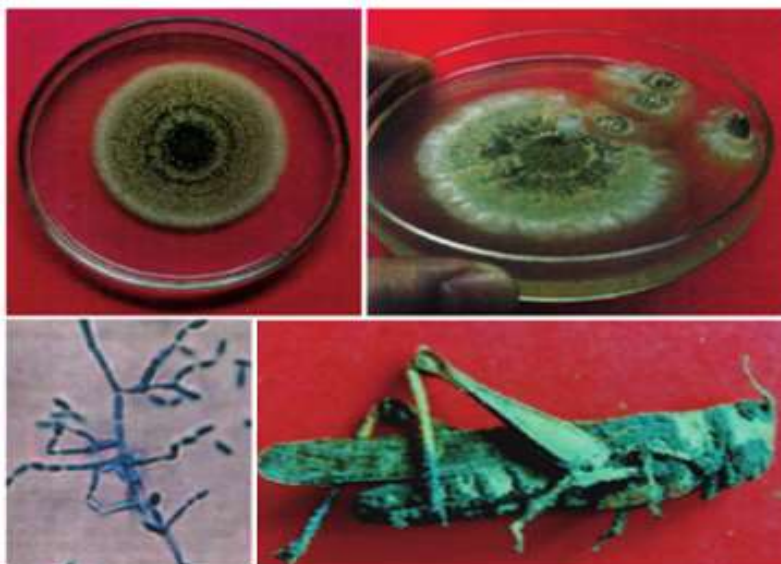
3.7. Metarhizium sp.

El género *Metarhizium*, perteneciente a la clase Deuteromycetes, está clasificado dentro de la familia Phialosporaceae, debido a que sus esporas son alargadas y se forman en cadenas originadas en fiálides¹²; el género fue descrito por Sorokin en 1883, como un hongo perteneciente a los hongos imperfectos, lo que hoy se conoce como hongos anamórficos o conidiales, ya que su fase sexual no se conocía y su taxonomía aun no es completamente clara, Tulloch (1976) realizó una revisión del género teniendo en cuenta las diferencias en la forma de los conidios y el color de las colonias reconociendo dos especies, la *M. anisopliae* y *M. flavoviride*. Para lo cual, se observó que las colonias de estos hongos no crecen muy rápido, en promedio crecen hasta 2 centímetros en un tiempo de 10 días a una temperatura promedio de 20°C; presentan colonias blancas cuando son jóvenes y verde oscuro cuando maduran; forman fiálides que pueden ser ramificadas, en conidióforos que nacen directamente del micelio; de acuerdo a la especie varía los conidios elipsoides y su tamaño, además son unicelulares, hialinos y se forman cadenas basípetas¹³ donde los conidios se adhieren unas con otras formando paquetes empalizados como se evidencia en la Imagen 2; el tamaño los conidios varía entre 7 a 9 micras de largo y 4,5 a 5 micras de ancho. El desarrollo óptimo del género *Metarhizium* se da a los 25°C en un rango de pH entre 3.3 y 8.5, el cultivo de este hongo entomopatógeno requiere una humedad relativa alta además de una alta presencia de dióxido de carbono [36, 40, 41, 42].

Imagen 2. *Metarhizium* sp [40]

¹² Célula terminal del conidióforo, en forma de botella que se une por su base en métula; constituye el soporte de los conidios [79]

¹³ Con desarrollo desde el ápice hacia la base [76]



El ciclo de la infección fúngica del *M. anisopliae* empieza con la adhesión del conidio en la cutícula del insecto hospedante, continuando con la germinación y la invasión a la hemolinfa¹⁴, donde se desarrolla dentro del cuerpo matando el insecto, donde el hongo comienza a salir del tegumento y forma micelio blanco aéreo que pronto se torna verde por la producción de conidios. El tiempo de muerte a causa de la infección varía de 2 a 15 días dependiendo de las características del hospedante y los factores abióticos en campo siendo las condiciones climáticas favorables de temperatura <30 °C y humedad >70%. Siendo el suelo su hábitat natural y su crecimiento saprofiticamente infecta a los hospedantes por medio de contacto a partir de los conidios en dormancia, en suelos francos arcillosos se encuentran en altas persistencias del hongo y en suelos provenientes de pasturas y de márgenes de suelos cultivados el hongo aumenta su densidad [41].

El *Metarhizium* constituye uno de los grupos más importantes de hongos entomopatógenos con fines prácticos de manejo utilizados como agentes de control biológico, ya que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos, comúnmente a Hemipteros, Dípteros, Coleópteros, Lepidópteros, Orthópteros e Hymenópteros; que por su amplio rango medioambiental y sus hospedantes es considerado entomológicamente cosmopolita, exhibiendo diferentes grados de especificidad que están influenciados por las características del patógeno y de la cutícula del hospedante, de igual manera este asimila muy bien las fuentes de carbono orgánico e inorgánico [41, 43].

3.8. *Galleria mellonella*.

Galleria mellonella se conoce también como la polilla grande de la cera, la cual pertenece a la familia de los pirálidos (Pyralidae), que constituye un grupo entre

¹⁴ Líquido del pseudoceloma de los nematodos [82].

los microlepidópteros y los macrolepidópteros debido a su tamaño [44]; estos manifiestan actividad nocturna y en su morfología presentan órganos timpánicos abdominales permitiendo así alta sensibilidad a las ondas sonoras que permiten la comunicación intraespecífica; las orugas de esta especie son fitófagas (se nutren de plantas), y la *Galleria* específicamente también se alimenta de cera, miel y polen de los panales [44, 45].

La hembra fecundada oviposita en las celdillas de las colmenas o un lugar dentro de la colmena que no esté protegido por las abejas, donde el número de huevos varía entre 400 y 800 con una dimensión de 0.45 mm x 0.35 mm. El factor ambiental es importante cuando se habla de las variables de temperatura y humedad ya que estos determinan el tiempo en que los huevos eclosionen, los cuales tardan de ocho a diez días si la temperatura varía entre los 30 - 32 °C, pero si esta es menor la eclosión puede durar meses [46].

En el momento en que las larvas salen empiezan una vida muy activa destruyendo la colonia con el aparato masticador que poseen, donde a su paso van dejando hilos sedoso y excrementos por los túneles hechos por estos de lado a lado del panal, esta etapa tiene una duración de semanas [46]. Luego de 19 días, cuando las larvas han crecido suficientemente para formar la crisálida, luego de buscar un lugar adecuado se envuelven en un capullo de seda donde en el interior hacen la crisálida que pueden durar 15 días; apenas sale del capullo, el adulto busca en reproducirse, volviendo a comenzar el ciclo donde la hembra coloca los huevos [47].

3.9. Control biológico de *Tecia solanivora*.

Desde el siglo XVII se conoce de la existencia de los parásitos de los insectos, pero hasta los años treinta se consideró la utilización de nematodos para el control de estos. Glaser y Fox, (1929) idearon métodos para cultivar los nematodos in vitro, después de observar como el nematodo *S. glaseri* infectaba larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*); ya para el año de 1930 Glaser produjo el número suficiente de nematodos aplicándolos a 73 parcelas diferentes de New Jersey para controlar el escarabajo japonés. Se recuperaron las larvas parasitadas en 72 de las 73 parcelas luego de dos semanas de aplicación; además, el nematodo persistió en cuatro de las parcelas alrededor de 8,5 años funcionando respectivamente como control biológico hacia el escarabajo japonés [48].

Por otro lado, en Brasil para el año de 1964 se adquirió la importancia de estudiar al hongo *Metarhizium* como control biológico de los cercópodos de la caña de azúcar, generando así que este entomopatógeno sea aplicado hasta en 100.000 ha/año de caña de azúcar para el control de *Mahanarva posticata* [49], conocida en Colombia como salivazo.

La utilización de nematodos se debe basar en un programa de manejo ecológico de plagas, ya que el ciclo de vida de un insecto plaga debe conocerse para

determinar la vulnerabilidad en relación con el medio ambiente y así definir la estrategia de manejo para la infección del nematodo [50].

En la universidad de Los Andes de Venezuela, se determinó la susceptibilidad de las larvas de polilla (*T. solanivora*) tras ser infectadas con *Steinernema feltiae* demostrándose que estos son capaces de reproducirse dentro de las larvas muertas de la polilla completando así su ciclo de vida; los resultados preliminares obtenidos demostraron la alta susceptibilidad que demuestra la polilla con la infección del nematodo generando hasta el 70% de mortalidad luego de 72 horas transcurrida la inoculación, sin embargo, dicha mortalidad puede aumentar incrementando la dosis del nematodo [51].

Por otro lado, la revista Journal of the Faculty of Sciences and Engineering de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, documenta un artículo acerca de la actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* sobre la polilla guatemalteca de la papa (*T. solanivora*) debido a su especificidad en el manejo de insectos plaga gracias a las proteínas Cry que al ser ingeridas por el insecto forma poros en las células intestinales generando la muerte de este [52]. Benítez y Duarte aislaron diferentes cepas de hongos entomopatógenos usando la metodología de Beding (1976) y de estos se encontraron dos cepas que en ensayos preliminares aplicando suspensiones de conidias en altas concentraciones sobre larvas de tercer instar de *T. solanivora*, mostraron una patogenicidad cercana al 100% [53].

3.10. Método estadístico Probit para la determinación de la concentración letal media.

La concentración letal media se considera como el valor generalmente en peso de la sustancia por unidad de volumen (mg/cm^3) que puede producir la muerte del 50% de la población expuesta [54]; esta es calculada estadísticamente, generalmente por el método Probit, el cual se basa en correlaciones entre una variable independiente (la concentración de la sustancia) y una variable dependiente (mortalidad) para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población y otros elementos vulnerables a la sustancia; este método permite estimar la CL_{50} ajustando los datos de mortalidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit [55].

La aceptabilidad de los resultados se determina de acuerdo al método de Tukey el cual ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor determinado junto con el análisis de varianza (ANOVA), el cual permite comparar el cociente de dos estimadores de varianza, es decir, se comparan los valores de un conjunto para determinar si son significativamente distintos de los valores de otro o más conjuntos de datos. Esta técnica contrasta dos hipótesis para rechazar o aceptar los resultados, la primera de ellas es la nula, en donde se plantea que todas las medias poblacionales son

iguales, es decir las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos y/o ensayos, la segunda hipótesis es la alternativa, la cual determina que las medias no son iguales, por lo que las diferentes concentraciones producen un efecto diferente en los organismos y/o ensayos [55].

4. Metodología

4.1. Producción de conidias de los hongos entomopatógenos.

De acuerdo a una revisión bibliográfica se determinó que el mejor medio de crecimiento para los hongos de estudio es el Agar de Dextrosa de Papa (PDA), se aplicó el siguiente procedimiento utilizando como base alimenticia este [56]. A

partir de las conidias aisladas de los hongos *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp procedentes de los laboratorios de la USTA y de la presentación granular de los hongos comerciales de *Beauveria* sp proveniente de Productos Biológicos Perkins LTDA, y *Metarhizium* sp proveniente de Biogama S.A.S., Se sembraron en cajas Petri con PDA dentro de una incubadora a 22 °C dejándolos durante un periodo de crecimiento necesario, reaislandolas varias veces hasta obtener un cultivo puro y de gran cantidad de conidias para la realización de los bioensayos (Figura 1).

A partir de los hongos puros dentro de las cajas Petri, de cada tipo de hongo entomopatógeno tratado se determinó la taxonomía de este mediante la visualización en el microscopio. Para esto fue necesario realizar la tinción de azul de lactofenol, la cual es empleada para observar hongos y así hacer fácil la visualización de las hifas y conidias para clasificarlas entre *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp.

Figura 1. Diagrama de flujo para la producción de conidias.



4.2. Cría de *Tecia solanivora*

Para el desarrollo reproductivo y de crecimiento de la *Tecia solanivora*, se tuvo en cuenta que son animales con reproducción sexual [57], el método más adecuado de la crianza de la polilla se realizó con variables ambientales controladas de temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 3$ y humedad relativa del $60\% \pm 5$; debido a que las hembras de la especie prefieren ovipositar en lugares cerca de la tierra y al tubérculo, por lo que se asimilaron dichas condiciones [58]. Las condiciones de temperatura y humedad son las condiciones de la ciudad de Bogotá por lo que se

criaron a temperatura y humedad ambiente, estas fueron medidas mediante un termómetro observando la temperatura en cada 24 horas garantizando que se mantuviera las condiciones requeridas, dicho instrumento fue situado dentro del compartimiento aislado.

Se usó un pie de cría proveniente de los laboratorios de CORPOICA sede Tibaitatá; inicialmente se colocaron los huevos en tubérculos limpios hasta la formación de las pupas, las cuales fueron trasladadas a un recipiente de 5 galones y se colectaron periódicamente los adultos que fueron emergiendo. Los adultos se trasladaron a frascos de vidrio de 300 ml en los cuales se colocó un algodón mojado con agua miel, dichos frascos se ubicaron con la abertura hacia abajo sobre un papel servilleta en el cual los huevos fueron ovipositados por las polillas y cada tercer día se hizo el cambio de servilletas sobre las cuales ovipositaron hasta que cumplieron su ciclo de vida. Finalmente, estos huevos se colocaron en bandejas con papas limpias repitiendo el proceso durante toda la duración de los bioensayos. En el momento de realizar el bioensayo se calculó su instar de desarrollo de acuerdo a la fecha de oviposición, donde se sacaron las larvas de los tubérculos con ayuda de un pela papas y un cuchillo [59].

4.3. Cría de *Galleria mellonella*

La metodología utilizada para el cultivo de *Galleria mellonella* fue adaptada de la metodología presentada por Realpe et. al, (2007); se mantuvo la cría de *Galleria mellonella* a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 80%, se usó una alimentación artificial a base de miel de abeja, glicerina, levadura, cera de abejas y salvado de trigo, la cual fue esterilizada a 1,0 atmósferas de presión durante un tiempo mínimo de 15 minutos. La preparación de la dieta inicio derritiendo 67 gramos de cera de abeja, esta fue adicionada a una mezcla previa de 464 gramos de salvado de maíz con 69 gramos de levadura seca homogeneizando la mezcla, finalmente se adiciono 207 gramos de glicerina y 193 gramos de miel de abejas obteniendo 1 kg de alimento [60].

El pie de cría son pupas provenientes del laboratorio de Productos Biológicos Perkins LTDA, ubicado en Cartago, Valle del Cauca. La cría se estableció en un cuarto específico en donde se ubicó un calentador de ambiente para alcanzar la temperatura óptima. Después de que las polillas emergieron se transfirieron a un recipiente de plástico de un litro de capacidad para las crías; dentro del recipiente se introdujeron tiras de papel dobladas en forma de acordeón que simulan las celdas de los panales en donde oviposita la *Galleria mellonella*, estos se sacaron cada tercer día y se transfirieron a una caja plástica de un litro de volumen que contiene la dieta anteriormente descrita. Tras emerger las larvas y estar en cuarto instar se transfirieron al recipiente de oviposición y se repitió el mismo procedimiento durante toda la duración de los ensayos [60]. Cuando se necesitaron las larvas para los bioensayos se buscaron en las cajas de cría y se determinó el instar de la larva de acuerdo a la fecha de oviposición y al tamaño de la larva, el cual se utilizaban larvas de tercer instar.

4.4. Ensayos preliminares para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos

Los ensayos preliminares permitieron determinar las condiciones base necesarias para garantizar la supervivencia de los individuos durante los bioensayos y así lograr resultados más certeros, garantizando en las siguientes pruebas que no son las condiciones las que afectan al individuo sino el tratamiento aplicado. En estos se consideraron los siguientes factores: recipiente, alimento, papel filtro y la humedad, para los cuales se realizaron 5 tratamientos con 3 réplicas cada uno y 3 individuos por unidad experimental. En la Tabla 2 se puede observar los tratamientos realizados en el ensayo preliminar.

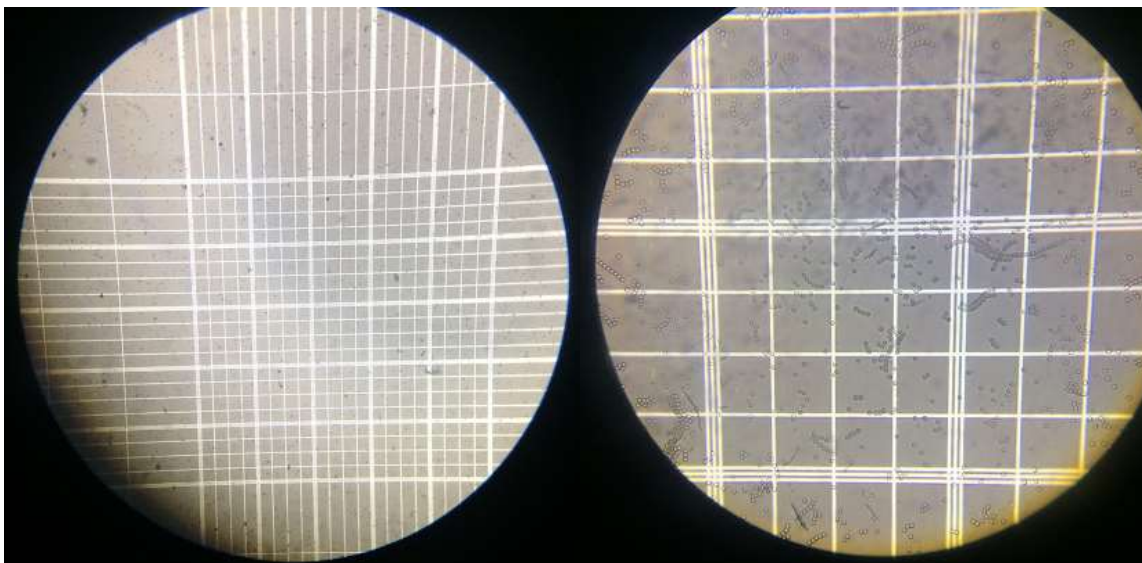
Tabla 2. Tratamientos del ensayo preliminar.

Tratamiento	Condiciones
T1	Recipiente
T2	Recipiente + Papel filtro
T3	Recipiente + Papel filtro + Agua destilada
T4	Recipiente + Alimento
T5	Recipiente + Alimento + Agua destilada

4.5. Ensayos para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos

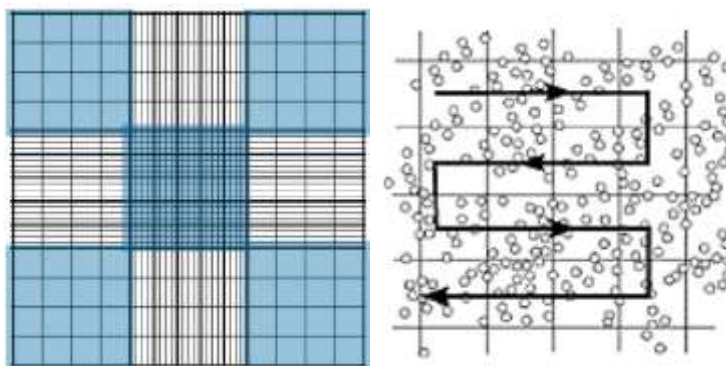
Con el fin de determinar la concentración de conidias para cada ensayo, se procedió a utilizar la cámara de Neubauer, la cual consta de dos cámaras con retícula cuadrangular para facilitar el conteo de conidias procedentes de los dos tipos de soluciones empleadas junto con el hongo evaluado. Con una pipeta de Pasteur plástica se depositó una gota proveniente de la mezcla entre la solución y el hongo evaluado en un extremo de la cámara dejando que esta se disperse entre la cámara de Neubauer y un cubreobjetos en la parte superior [61]. Posteriormente, se observó en el microscopio a un aumento de 40x la retícula cuadrangular junto con las conidias a contar como se puede evidenciar en la Imagen 3.

Imagen 3. Vista desde el microscopio de la retícula cuadrangular de la cámara de Neubauer.



Al momento de contar las conidias observadas en el microscopio, solo se debe tener en cuenta los 5 cuadros grandes de la cámara y en cadena por cada uno de los cuadros pequeños como se evidencia en la Imagen 4 [61].

Imagen 4. Retícula cuadrangular de la cámara de Neubauer [61].



Al terminar el recuento de conidias por cada cuadro grande se procedió a aplicar la siguiente formula permitiendo determinar la concentración de esporas que habia en la mezcla entre la solución y el hongo evaluado [61].

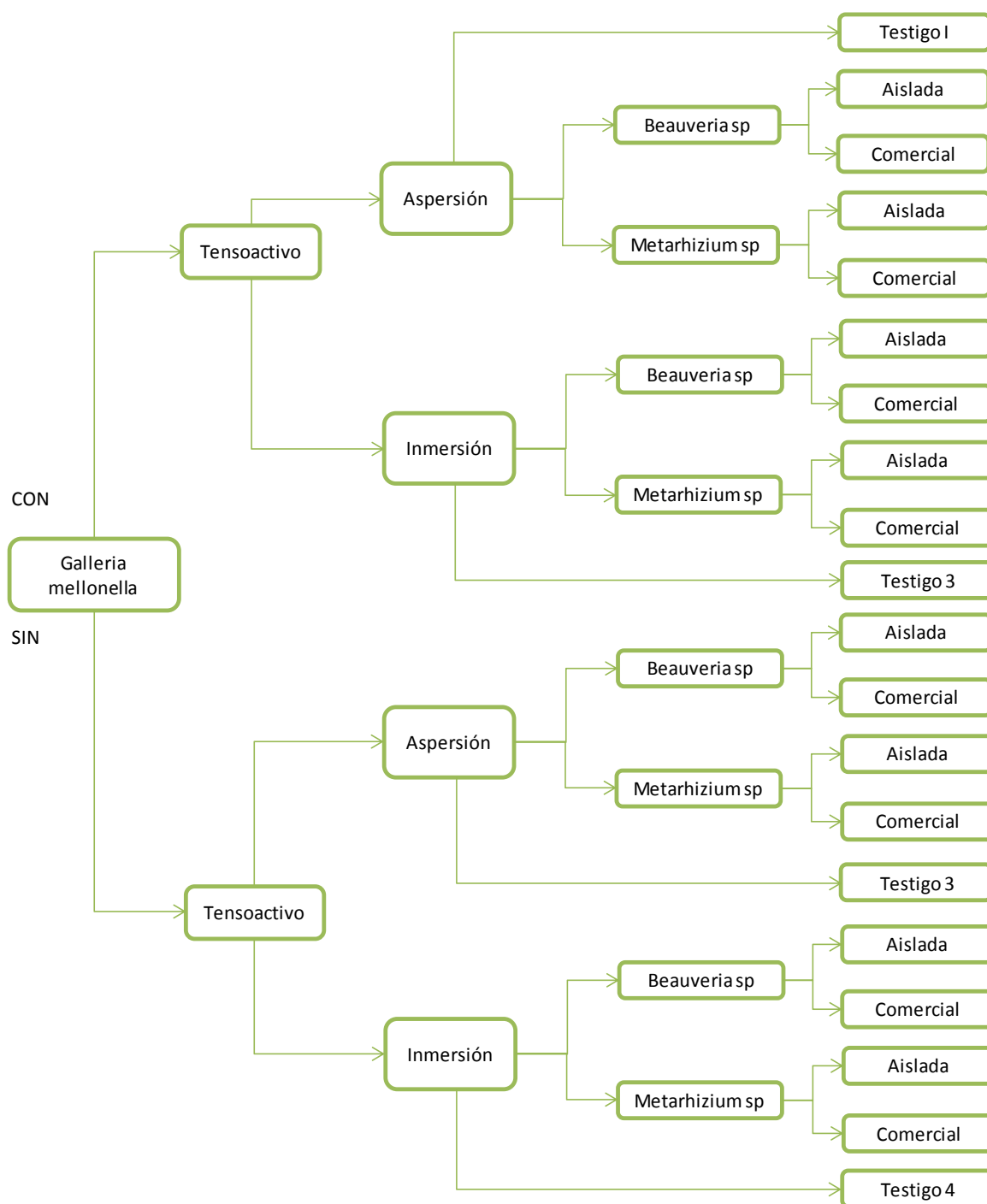
$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de conidias} \times 10.000}{\text{número de cuadros}} \quad (1)$$

A partir de lo anterior y con el fin de determinar de manera segura las concentraciones a utilizar en los ensayos con la *Tecia solanivora*, se procedió a emplear el método de diluciones decimales seriadas, donde se partió de una concentración máxima para cada hongo evaluado. Con el fin de reducir el orden de las concentraciones se utilizaron 4 tubos de ensayo con 9 ml de la solución inicial sin hongo y una micropipeta donde esta se carga cada vez con 1 ml de la mezcla anterior agitando y cambiando las puntas por cada cambio de tubo, hasta llegar a las concentraciones deseadas.

La literatura reporta dos maneras en las que se pueden aplicar las conidias de hongos entomopatógenos sobre insectos en condiciones de bioensayo, estas son por aspersión y por inmersión; además se puede usar un tensoactivo que podría aumentar la efectividad de la infección del hongo [62]. Por este motivo se realizó un ensayo para determinar el tipo de aplicación. Este ensayo se hará sobre larvas de *Galleria mellonella* ya que su ciclo de vida es más corto y permite que la cantidad de individuos sea mayor en un periodo más corto en comparación con la *Tecia solanivora*, además presentan características similares.

Este ensayo tuvo en cuenta tres factores, el primer factor es el tipo de aplicación por aspersión o por inmersión, el segundo factor es el uso de un agente tensoactivo (tween 80), el cual permite una mejor adherencia entre las conidias de los hongos entomopatógenos y el tegumento de las larvas, por lo cual se realizaron pruebas con la presencia o ausencia del mismo. Finalmente, el tercer factor fue el patógeno aplicado, en este caso son *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp teniendo en cuenta que fueron usadas las cepas aisladas en los laboratorios de la USTA y las comerciales. Los tratamientos se realizaron en cajas Petri en presentación pequeña, se dispuso de 4 larvas de *Galleria mellonella* por caja con 2,5 g de alimento y humedecido con 1 ml de agua destilada. Cada uno de los tratamientos contó con cinco repeticiones por lo que se tuvo un total de 100 cajas Petri y 400 larvas para este ensayo en un diseño completo al azar, para lo cual se realizaron 20 tratamientos debidamente descritos en el Imagen 5. Donde se buscó que las concentraciones de la mezcla entre la solución y el hongo oscilaran entre $6 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$ y $6,9 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$.

Imagen 5. Esquema de los tratamientos para la determinación del método de infección



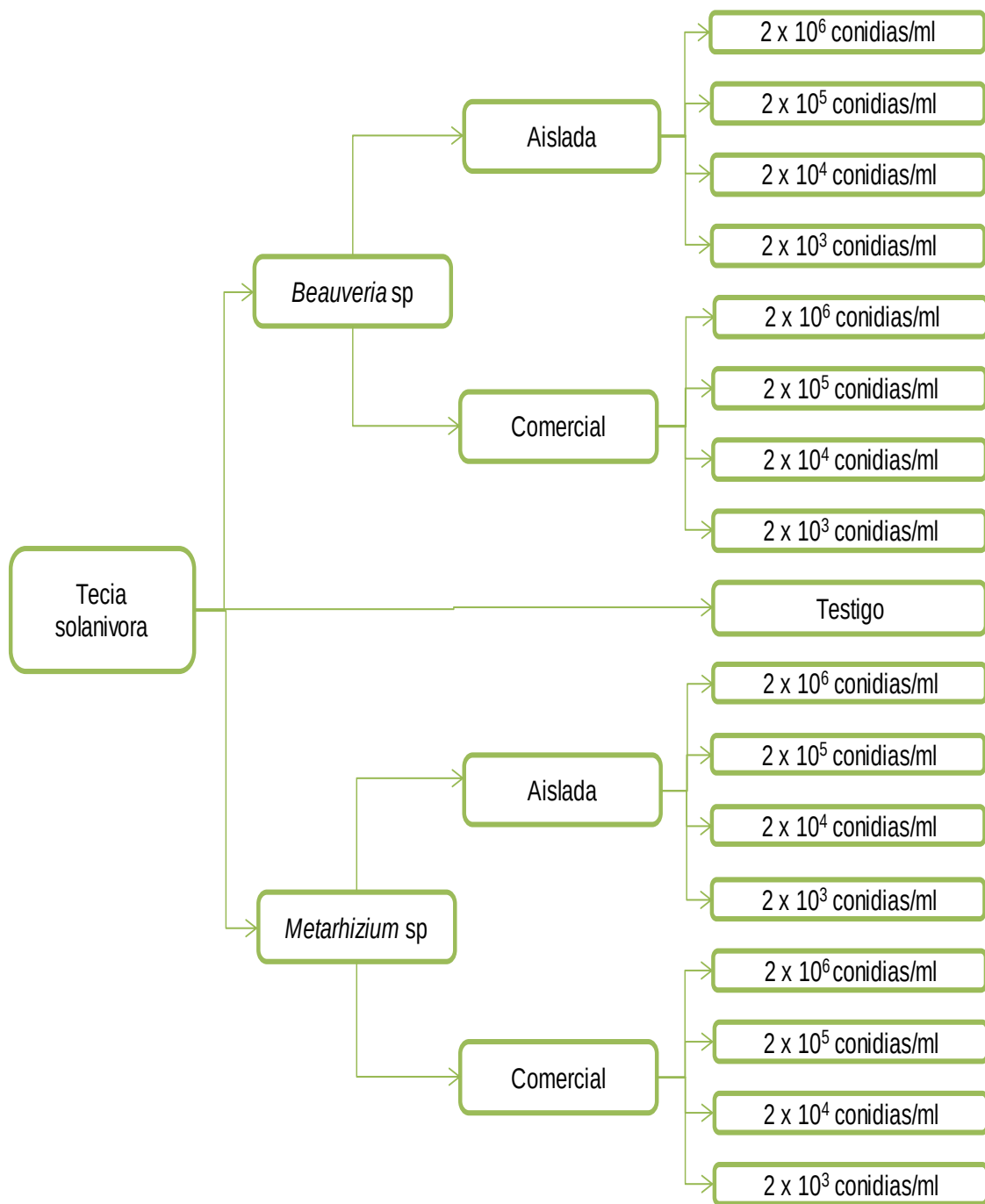
En estos ensayos de acuerdo a la investigación realizada por Benítez y Duarte [63] se determinó que el tiempo óptimo de inmersión en las pruebas de laboratorio es de 30 segundos, para las pruebas de aspersión se aplicaron dos aspersiones directamente sobre los tegumentos los cuales equivalen a $1 \pm 0,1$ ml. Finalmente, se halló el área bajo la curva de cada replica a partir del programa OriginPro, para luego poder realizar el análisis estadístico de varianza de tres factores con prueba de comparación múltiple por Tukey en el programa SPSS para aceptar o rechazar el previo ensayo y poder continuar con el desarrollo de la investigación.

4.6. Ensayos para determinar la CL₅₀ de las cepas evaluadas

Para la determinación de la concentración letal media se realizó un ensayo de dos factores (4x4 + un testigo), el primero son las cepas a utilizar, es decir, *Beauveria* sp aislada, *Metarhizium* sp aislada, *Beauveria* sp comercial y *Metarhizium* sp comercial; el segundo factor es la concentración de la suspensión de conidias, el cual estará medido en $\# \text{conidias} / \text{ml}$. En la Imagen 6 se observa los tratamientos necesarios para la determinación de la CL₅₀.

La técnica de aplicación determinada en el punto anterior fue ejecutada en este procedimiento sobre las larvas de *Tecia solanivora*, de acuerdo a la metodología utilizada por Benítez y Duarte [63] y la cantidad de individuos a disponer por cada unidad experimental se determinó de acuerdo a lo establecido por Repetto et. al, [54] en el ensayo preliminar se dispuso de 6 larvas por caja Petri en presentación pequeña, papel filtro y 2.7gr de papa en cada caja, cada uno de los tratamientos contó con tres repeticiones. Finalmente, se hizo un gráfico del efecto de los tratamientos en el tiempo y se halló por integración el área bajo la curva de cada replica por medio del programa OriginPro®, y así realizar el análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple por Tukey. Con el valor de mortalidad acumulada hasta el octavo día determinó la CL₅₀ usando el programa ProStat y aplicando el modelo probit.

Imagen 6. Esquema de los tratamientos para la determinación de la concentración letal media.

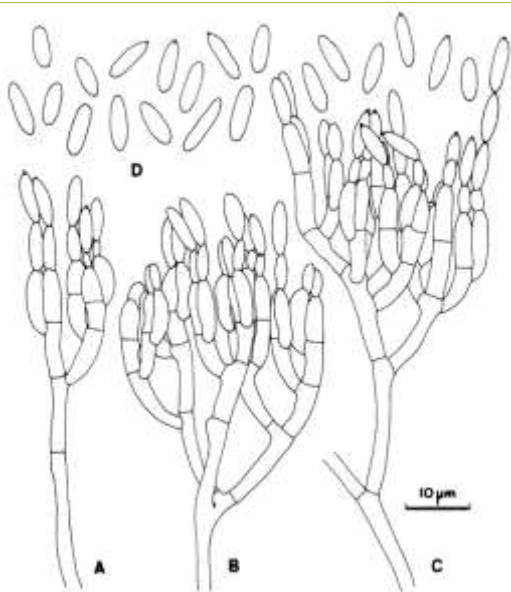


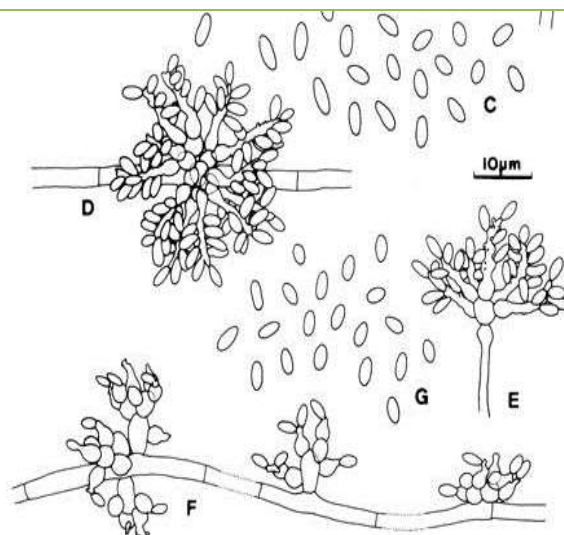
5.Resultados y discusión

5.1. Confirmación de la taxonomía de los hongos de estudio.

La confirmación se determinó mediante la comparación visual con la bibliografía en donde se logró observar la forma característica hilada esférica de las conidias de *Beauveria* sp junto con un color blanco. Adicionalmente para el caso del *Metarhizium* sp se observó un color verde azulado de textura pastosa con esporas de forma alargada y visible en cadena. Se llevó a cabo un registro fotográfico demostrando la información anterior como puede ser observado en la Imagen 7.

Imagen 7. Registro fotográfico para la identificación de los hongos entomopatógenos.

	Observado	Bibliografía
<i>Metarhizium</i> sp		 Fuente: [64]



Fuente: [64]

5.2. Cría de la Galleria mellonella

Teniendo en cuenta que el estado en el que se adquirió inicialmente la *Galleria mellonella* fue de pupa (inicio del ciclo de crianza); dentro de este no se tuvo inconvenientes ya que se contaba con la metodología de Benítez y Duarte [63] para el correcto desarrollo de pupa a adulto junto con las condiciones adecuadas y necesarias como se puede evidenciar en la Imagen 8, además del método de recolección de huevos para continuar con el proceso en el siguiente estado.

Imagen 8. Ciclo de vida de la *Galleria mellonella* – estado de pupa y adulto.



En el traslado de las celdas ovipositadas por los adultos de la *Galleria mellonella* se tuvieron inconvenientes al intentar buscar una distribución homogénea en el alimento, por lo tanto, se decidió dejar las celdas completas y en una distribución de 3 por contenedor como se evidencia en la Imagen 9; es importante destacar que cada contenedor estaba debidamente rotulado con la fecha de recolección para poder calcular correctamente el instar de la futura larva.

Imagen 9. Ciclo de vida de la *Galleria mellonella* – estado de huevo.



Finalmente, el estado que presentó varios inconvenientes fue el de larva, principalmente en su almacenamiento por los materiales implementados, puesto que la superficie que tapaba el contenedor era tela a base de componentes naturales causando que las larvas se alimentaran de este y así salirse de su contención, provocando desorden en el área y la pérdida de muchos individuos ya que no era posible garantizar el instar en el que se encontraban, por lo tanto se hizo necesario tomar medidas adicionales como el cambio de contenedores a unos de tapa plástica de un mayor calibre que imposibilitara su salida, a las cuales se les modifico para tener la correcta aireación.

Imagen 10. Ciclo de vida de la *Galleria mellonella* – estado de larva.



5.3. Cría de *Tecia solanivora*

La *Tecia solanivora* fue adquirida en su estado de huevo, junto con la fecha de oviposición, la cual permitió determinar el periodo de cada estado de su ciclo de vida, sin embargo, debido a la presentación en la que se adquirieron los huevos y a la oviposición de los mismos, no fue posible realizar una correcta distribución sobre los tubérculos, puesto que el área superficial que sostiene los huevos no era suficiente para abarcar la cantidad que se utilizó, debido a esto el proceso de descomposición se dio de manera desigual, causando que los fluidos provenientes de los tubérculos dañados afectaran la arena, dificultando la recolección de las pupas (Imagen 11 e Imagen 12).

Imagen 11. Ciclo de vida de la *Tecia solanivora* – estado de huevo.



Imagen 12. Ciclo de vida de la *Tecia solanivora* – estado de larva y pupa



Tras la eclosión de las pupas recolectadas anteriormente los adultos presentaron una aglomeración alrededor de las pupas (Imagen 13), dificultando la recolección total de estos, sin embargo, debido a la cantidad obtenida de adultos y su actividad nocturna facilitó la recolección para el almacenamiento en los recipientes de vidrio observados en la Imagen 14 con el objetivo de continuar con el proceso y realizar la adecuada recolección de huevos, etapa que no tuvo mayor inconveniente.

Imagen 13. Ciclo de vida de la *Tecia solanivora* – estado de pupa y adulto



Imagen 14. Sistema de recolección de huevos.



5.4. Ensayos preliminares para determinar el mejor método de infección por hongos entomopatógenos

En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos en el ensayo preliminar de acuerdo a cada tratamiento, en donde se describe la cantidad de individuos muertos teniendo en cuenta que el periodo de registro fue cada 48 horas.

Tabla 3. Registro del número de individuos muertos del ensayo preliminar.

Horas	48	96	144	192	240	288	336
T1.1	-	-	-	-	-	2	2
T1.2	-	-	-	-	2	2	2
T1.3	-	-	-	-	1	1	1
T2.1	-	-	-	-	-	-	-
T2.2	-	-	-	-	1	1	1
T2.3	-	1	1	1	2	2	2
T3.1	-	-	1	1	1	1	1
T3.2	-	-	-	-	-	-	-
T3.3	-	-	-	-	-	-	-
T4.1	-	-	-	-	-	-	-
T4.2	-	-	-	-	-	-	-
T4.3	-	-	-	-	-	1	1
T5.1	-	-	-	-	-	-	-
T5.2	-	-	-	-	-	-	-
T5.3	-	-	-	-	-	-	-

Con base en los anteriores resultados se determinó que las condiciones óptimas para los ensayos son las dadas por el tratamiento 5, ya que en esta prueba no se presentó ningún muerto durante todo el periodo del ensayo, por lo que con dichas condiciones se procedió a realizar los demás bioensayos.

5.5. Determinación del mejor método de infección de los hongos entomopatógenos.

Para la determinación del mejor método de infección se realizaron 20 tratamientos descritos a continuación en la Tabla 4. Calculando la concentración de conidias para cada hongo evaluado oscilando entre $6,1 \times 10^5$ y $6,7 \times 10^5$, como se evidencia en el Anexo A acerca de la memoria de cálculo de este ensayo.

Tabla 4. Tratamientos para el método de infección

T1	Agua + inmersión
T2	Agua + Tween 80 + Inmersión
T3	Agua + Aspersión
T4	Agua + Tween 80 + Aspersión
T5	Agua + Beauveria A + Inmersión
T6	Agua + Beauveria C + Inmersión
T7	Agua + Tween 80 + Beauveria A + Inmersión
T8	Agua + Tween 80 + Beauveria C + Inmersión
T9	Agua + Beauveria A + Aspersión
T10	Agua + Beauveria C + Aspersión
T11	Agua + Tween 80 + Beauveria A + Aspersión
T12	Agua + Tween 80 + Beauveria C + Aspersión
T13	Agua + Metarhizium A + Inmersión
T14	Agua + Metarhizium C + Inmersión
T15	Agua + Tween 80 + Metarhizium A + Inmersión
T16	Agua + Tween 80 + Metarhizium C + Inmersión
T17	Agua + Metarhizium A + Aspersión
T18	Agua + Metarhizium C + Aspersión
T19	Agua + Tween 80 + Metarhizium A + Aspersión
T20	Agua + Tween 80 + Metarhizium C + Aspersión

Los resultados de la cantidad de larvas muertas fueron registrados cada 24 horas durante 18 días registrando el número de muertos en el transcurso de los días como se puede evidenciar en el Anexo B. Los resultados obtenidos se agruparon de acuerdo a las ramas principales del esquema inicial, es decir, se realizaron cuatro gráficas que permitieron comparar los resultados de acuerdo a los subgrupos y el porcentaje de individuos muertos, se debe considerar que se logró mantener el rango de las concentraciones aplicadas como se observa en la Tabla 5, la cual demuestra la concentración manejada en cada uno de los tratamientos, demostrando que se mantuvo el rango establecido en la metodología para la realización de las presentes pruebas.

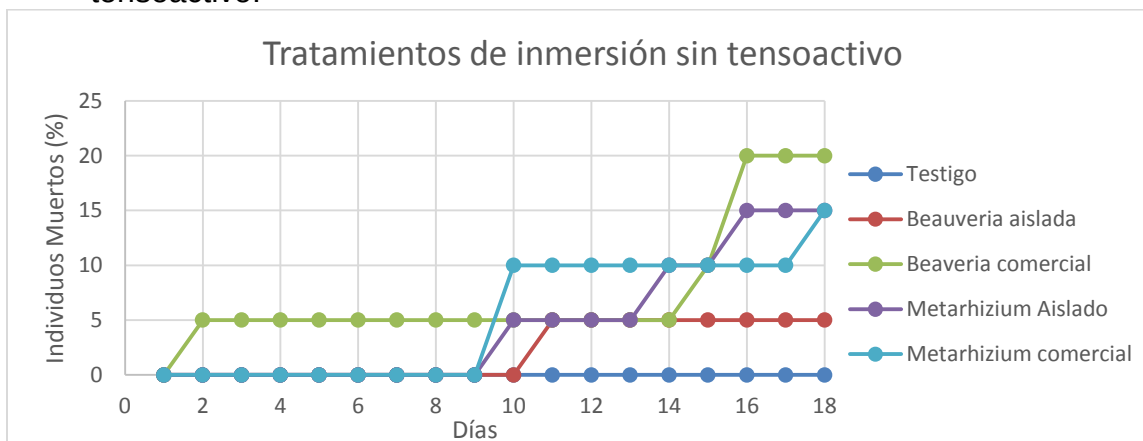
Tabla 5. Concentraciones para los ensayos del método de infección.

Tratamiento	Concentración (conidias/ml)
<i>Metarhizium</i> sp aislado sin tensoactivo	6,1 x 10 ⁵
<i>Metarhizium</i> sp aislado con tensoactivo	6,6 x 10 ⁵
<i>Metarhizium</i> sp comercial sin tensoactivo	6,1 x 10 ⁵
<i>Metarhizium</i> sp comercial con tensoactivo	6,7 x 10 ⁵
<i>Beauveria</i> sp aislado sin tensoactivo	6,7 x 10 ⁵
<i>Beauveria</i> sp aislado con tensoactivo	6,2 x 10 ⁵
<i>Beauveria</i> sp comercial sin tensoactivo	6,5 x 10 ⁵
<i>Beauveria</i> sp comercial con tensoactivo	6,4 x 10 ⁵

En la Gráfica 1 se observa que se obtuvo la mayor mortalidad del tratamiento con inmersión sin la presencia del tensoactivo para la aplicación de la *Beauveria* sp comercial con el 20% de individuos muertos al finalizar el periodo de tiempo de registro, sin embargo el menor porcentaje de mortalidad se dio a su vez con la *Beauveria* sp aislada con tan solo el 5%, a pesar de esto, la cepa aislada de *Beauveria* sp presento las primeras muertes hasta el décimo día de registro y permaneció constante hasta finalizado el experimento, por el contrario la *Beauveria* sp comercial presento un cambio abrupto en su mortalidad desde el día 14, ya que la cantidad de individuos muertos permaneció constante desde el día 2 hasta su perturbación.

Por otro lado, cabe resaltar que si bien ambos tratamientos de *Metarhizium* sp aislada y comercial alcanzaron el mismo porcentaje de mortalidad (15%), fue el comercial el primero en alcanzar mayor mortalidad, es decir, al día 10 de registro este se encontraba en 10% mientras que el aislado tan solo presentaba 5% de los individuos muertos, sin embargo, la esta relación se presentó de forma inversa el día 16, en donde la cepa aislada superaba la comercial en un 5% de diferencia; adicionalmente, se puede demostrar la validez de los ensayos ya que como observamos el testigo no demostró individuos muertos, por lo que se garantiza que las condiciones preliminares determinadas con los ensayos preliminares permitieron que el efecto causado sobre los individuos sea causado por el tratamiento y no por las condiciones ambientales.

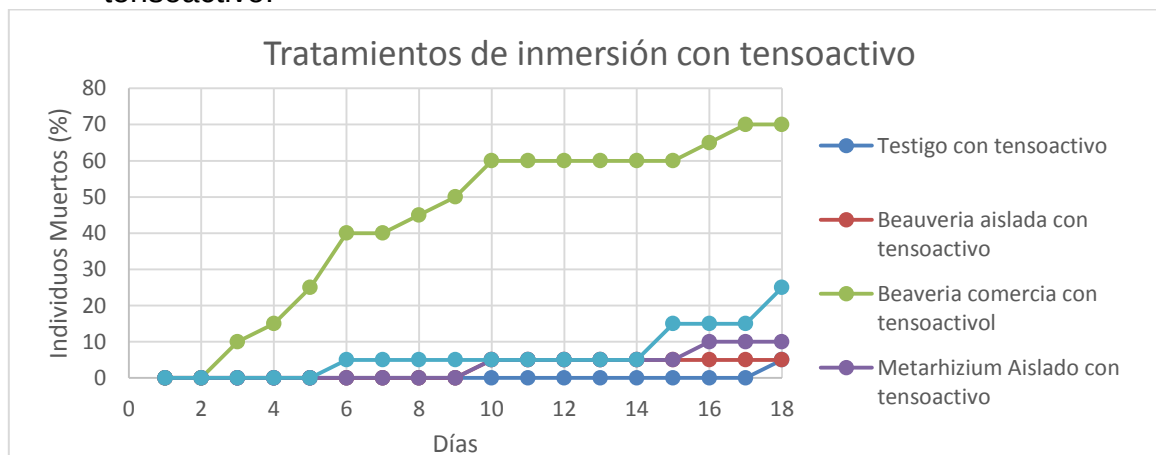
Gráfica 1. Tratamientos de inmersión para las cuatro cepas de estudio sin tensoactivo.



En la Gráfica 2 se evidencia que para este ensayo con la presencia del tensoactivo, el tratamiento que corresponde a *Beauveria* sp comercial por medio del método de inmersión con tensoactivo (Tween 80) supera el porcentaje de los individuos muertos de todos los tratamientos desde el día 3 del ensayo hasta su finalización con el 70%, seguido de este el tratamiento del *Metarhizium* sp comercial logró el 25% de los individuos muertos al finalizar el periodo de registro obteniendo sus primeras muertes en el día 6, demostrando mayor rapidez en su efecto que el *Metarhizium* sp aislado que logró sus primeras muertes al cabo de 10 días, con un total del 10% de los individuos muertos al finalizar el periodo de registro.

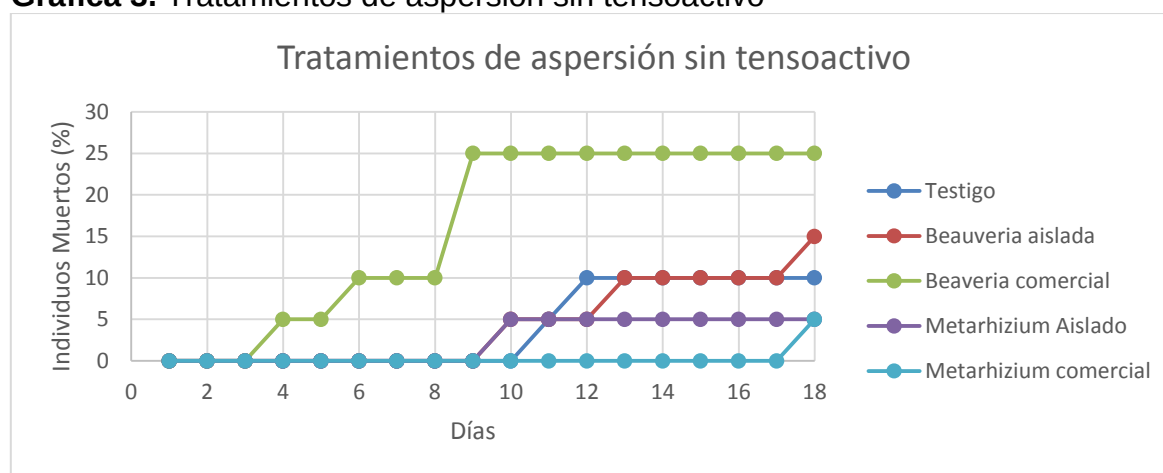
El tratamiento de la *Beauveria* sp aislada obtuvo un comportamiento casi constante, y al igual que el testigo solo se obtuvo un 5% de los individuos muertos, sin embargo, el testigo presentó su primera muerte hasta el penúltimo día de registro, mientras que el tratamiento de la *Beauveria* sp aislada tuvo efecto sobre la muerte de los individuos desde el noveno día del tiempo de estudio.

Gráfica 2. Tratamientos de inmersión para las cuatro cepas de estudio con tensoactivo.



Con respecto a la Gráfica 3, los datos estuvieron bajo el 30% de individuos muertos, en donde el máximo valor alcanzado fue del 25% para el tratamiento de la *Beauveria* sp comercial, alcanzando su máximo valor desde la mitad del tiempo de registro y manteniéndose sin cambios hasta el final del mismo, el tratamiento de la *Beauveria* sp aislada no presentó grandes variaciones hasta el día noveno de registro a partir del cual presento un aumento progresivo hasta alcanzar su máximo registro de 15%; adicionalmente el menor porcentaje obtenido fue del 5% correspondiente a los tratamientos de *Metarhizium* sp comercial y aislada, por lo que obtuvieron el mismo resultado, sin embargo el efecto de la cepa aislada se presentó desde el día 9 mientras que para la cepa comercial se presentó hasta el día 17 del periodo de registro.

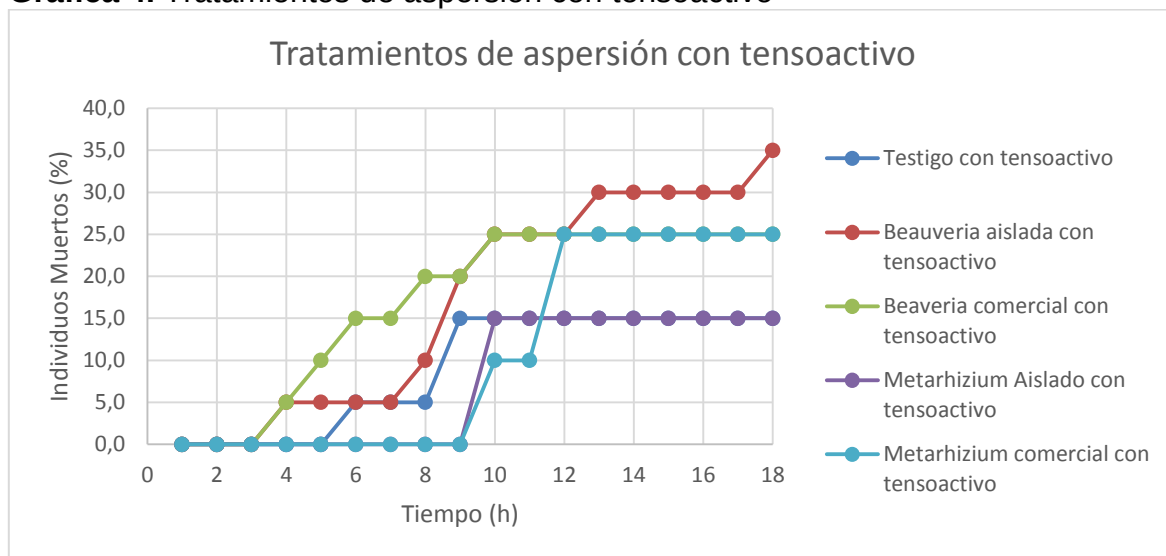
Gráfica 3. Tratamientos de aspersión sin tensoactivo



La Gráfica 4 demuestra que el tratamiento correspondiente a *Beauveria* sp comercial con tensoactivo tiene una mayor respuesta desde un periodo más corto y de mayor permanencia a lo largo del tiempo en relación con los demás, sin embargo, al llegar el día decimo del registro este alcanza su valor máximo con un 25% permaneciendo así hasta el final del ensayo, por otro lado, el tratamiento con la *Beauveria* sp aislada con tensoactivo presentó los primeros individuos muertos hasta el día cuarto, manteniendo un progreso continuo hasta alcanzar su valor máximo del 35%, siendo este el mayor porcentaje registrado para esta prueba.

Los ensayos de *Metarhizium* sp comercial y aislada, demostraron comportamientos similares, sin embargo el aislado evidenció los primeros individuos muertos desde el día 10 y permaneció constante con el 15%, a pesar de esto, la cepa comercial presento solo el 10% de individuos muertos para ese mismo periodo de tiempo pero continuo aumentando hasta su valor máximo del 25% tras el día 12 del registro. En este ensayo se evidenció que el testigo alcanzo un porcentaje más alto en comparación con los demás testigos ya que este presento individuos muertos desde el sexto día pero se mantuvo en 15% de individuos muertos hasta finalizar el ensayo.

Gráfica 4. Tratamientos de aspersión con tensoactivo

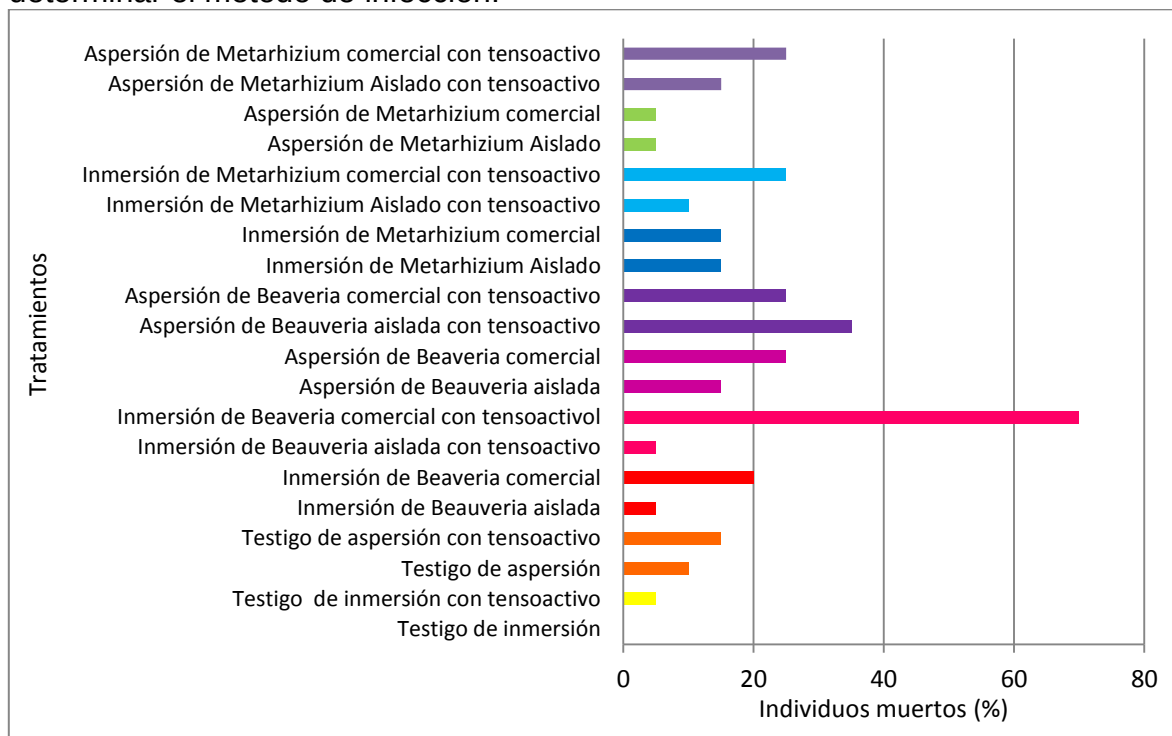


Fue necesario comprar los resultados obtenidos de todos los tratamientos considerados para este ensayo, por lo que podemos observar en la Grafica 5, el porcentaje total de individuos muertos para el último día de registro en todos los tratamientos.

En el caso del *Metarhizium* sp se presentó igual porcentaje de mortalidad en la aspersión e inmersión de las cepas comerciales con la presencia del tensoactivo con un valor máximo del 25%, seguidos de estas, se evidenció un 15% de individuos muertos para el tratamiento de la cepa aislada por aspersión con la presencia del tensoactivo, porcentaje igualado por los tratamientos de inmersión sin la presencia del tensoactivo pero por el método de inmersión para las cepas comercial y aislada; bajo las condiciones de la cepa aislada con inmersión y tensoactivo, solo se obtuvo el 10% y finalmente para la aspersión sin tensoactivo de ambas cepas se obtuvo solo el 5%.

Para los tratamientos con la *Beauveria* sp se evidenció el total del 70% de la mortalidad en la inmersión con tensoactivo para la cepa comercial como su mejor resultado, seguido del tratamiento por aspersión con tensoactivo con un valor del 35% para la cepa aislada, posterior a este se obtuvo el 25% de los individuos muertos para los tratamientos de las cepas comerciales por aspersión con y sin la presencia de tensoactivo; por lo que en general para los tratamientos con *Beauveria* sp los mejores resultados se presentaron por el método de aspersión, sin embargo debido a los resultados obtenidos en ambos métodos para los testigos, fue necesario considerar el método de inmersión como el mejor método de aplicación debido a que en los ensayos de aspersión se presentaron individuos muertos en los testigos por lo que no se garantizaría que el tratamiento (el efecto del hongo entomopatógeno) sería el único factor que afectaría el porcentaje de individuos muertos.

Grafica 5. Porcentaje de mortalidad al día 18 de los tratamientos evaluados para determinar el método de infección.



Partiendo de los datos y gráficas anteriores, se procedió a hallar el área bajo la curva de cada tratamiento con sus respectivas replicas, las cuales fueron utilizadas para el análisis estadístico realizando un análisis de varianza, el cual arrojó que la significancia de los datos fue de 0 rechazando la hipótesis nula por lo tanto los datos obtenidos de este ensayo son estadísticamente representativos y no poseen ninguna igualdad de medidas. Por otro lado, se obtienen los resultados del análisis por Tukey donde el tratamiento 8 correspondiente a Tween 80 + inmersión, el cual genera un resultado de menor significancia con un valor de 0 con respecto a los demás tratamientos, como se puede evidenciar en el Anexo C.

De los resultados obtenidos estadísticamente, se determinó que el mejor método de infección es la inmersión con tensoactivo, puesto que en este tratamiento se presentaron los mayores niveles de mortalidad en los tratamientos para las cuatro cepas de estudio y sus resultados estadísticos; es importante resaltar que la efectividad del hongo puede verse afectada por el método de infección ya que este incide principalmente en la primera etapa de su método de acción, es decir, en la adhesión [65], adicionalmente, dentro de los resultados fue observado que los hongos entomopatógenos que se utilizaron directamente del tegumento de individuos previamente afectados, fueron de mayor eficacia que aquellos hongos provenientes de un medio de cultivo.

5.6. Determinación de la CL₅₀ de los hongos entomopatógenos sobre la *Tecia solanivora*.

Para la determinación de la CL₅₀, se realizó una mezcla entre el tensoactivo (Tween 80) al 0,03% con agua destilada y con cada uno de los hongos evaluados anteriormente, tratando de llegar a una máxima concentración que se pudiese contar por la cámara de Neubauer y manteniendo los valores entre un rango que osciló entre $6,5 \times 10^6$ y $6,9 \times 10^6$; los cálculos de cada concentración se pueden evidenciar en el Anexo D. Partiendo de cada concentración máxima se procedió por el método de dilución decimal seriada disminuyendo el orden hasta llegar a 10^3 para cada tipo de hongo y su correspondiente tratamiento como se evidencia en la Tabla 6.

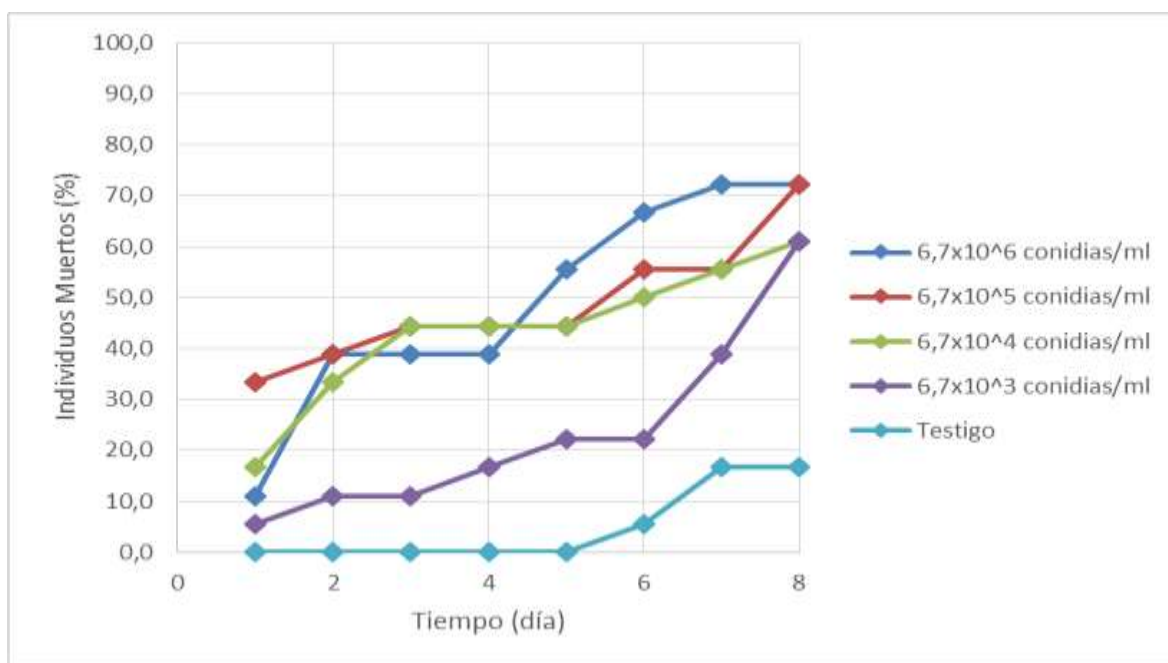
Tabla 6. Tratamientos para determinar la CL₅₀ de los hongos entomopatógenos.

Tratamiento	Hongo	Concentración (conidias/ml)
T 1	Beauveria Aislada	$6,7 \times 10^6$
T 2	Beauveria Aislada	$6,7 \times 10^5$
T 3	Beauveria Aislada	$6,7 \times 10^4$
T 4	Beauveria Aislada	$6,7 \times 10^3$
T 5	Beauveria Comercial	$6,9 \times 10^6$
T 6	Beauveria Comercial	$6,9 \times 10^5$
T 7	Beauveria Comercial	$6,9 \times 10^4$
T 8	Beauveria Comercial	$6,9 \times 10^3$
T 9	Metarhizium Comercial	$6,6 \times 10^6$
T 10	Metarhizium Comercial	$6,6 \times 10^5$
T 11	Metarhizium Comercial	$6,6 \times 10^4$
T 12	Metarhizium Comercial	$6,6 \times 10^3$
T 13	Metarhizium Aislado	$6,5 \times 10^6$
T 14	Metarhizium Aislado	$6,5 \times 10^5$
T 15	Metarhizium Aislado	$6,5 \times 10^4$
T 16	Metarhizium Aislado	$6,5 \times 10^3$
T 17	Testigo	

El periodo del ensayo fue de 8 días, donde cada 24 horas se registraron los datos de los individuos muertos en el transcurso del mismo, dichos datos se evidencian en el Anexo E. Partiendo de estos datos se graficó cada hongo con sus respectivas concentraciones contrastándolos junto con el testigo y así evidenciar el comportamiento de las variables del ensayo durante el mismo.

De acuerdo a la Gráfica 6 la concentración del hongo de *Beauveria* sp aislada con mayor respuesta ante el porcentaje de individuos muertos fue de $6,7 \times 10^5$ conidias/ml, teniendo en cuenta que desde el primer día tuvo un 33,3% de mortalidad, ascendiendo durante el ensayo hasta llegar a un 72,2% como porcentaje máximo de mortalidad de este subconjunto de resultados; por otro lado, se evidencia que de manera general la concentración fue directamente proporcional a la mortalidad efectuada por la cepa de este hongo; aunque la concentración de $6,7 \times 10^6$ conidias/ml en el inicio del ensayo no obtuvo un porcentaje alto con respecto al del orden anterior, durante el lapso del quinto al octavo día fue la concentración que tuvo mayor porcentaje de individuos muertos hasta obtener y al final de este obtuvo los mismos resultados que la concentración de mayor respuesta.

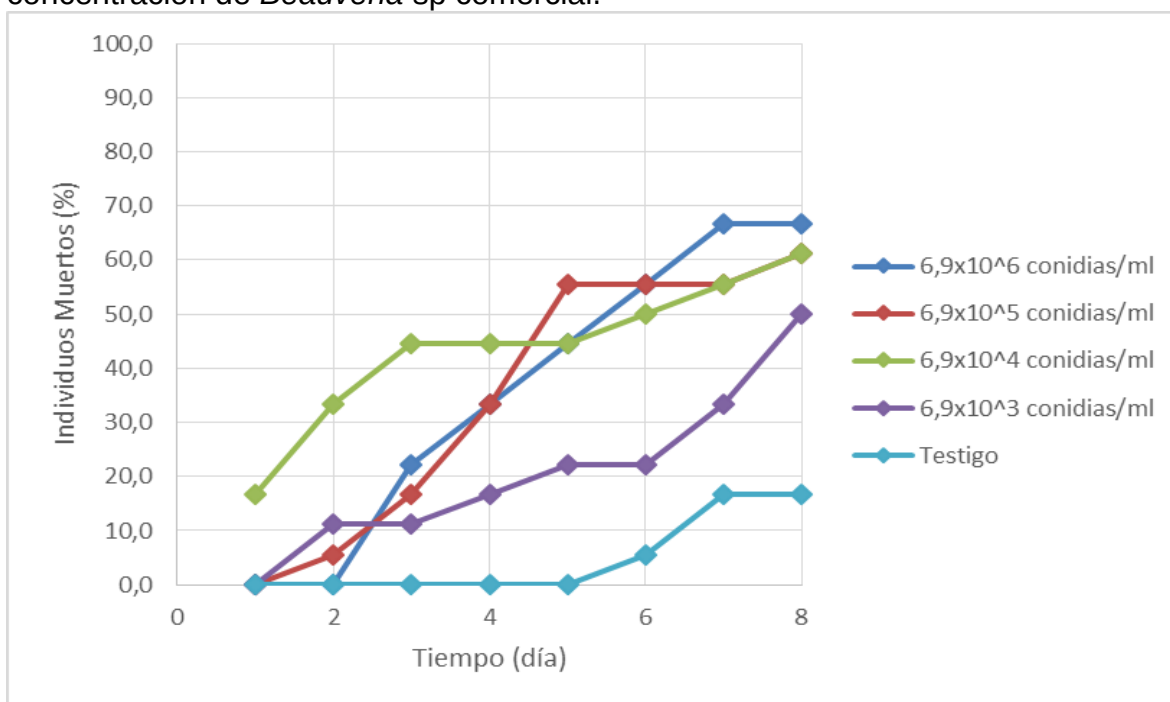
Gráfica 6. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de *Beauveria* sp aislada.



Con respecto a la Gráfica 7 la concentración de mayor respuesta de porcentaje de individuos muertos en el tiempo es de $6,9 \times 10^4$ conidias/ml, ya que fue la única que obtuvo resultados de mortalidad desde el primer día y durante más de la mitad del ensayo alcanzó los mayores resultados; además, las concentraciones de mayor orden al inicio del ensayo fueron las que presentaron menores porcentajes de mortalidad y a partir del tercer día la pendiente de estas fueron mayores durante el

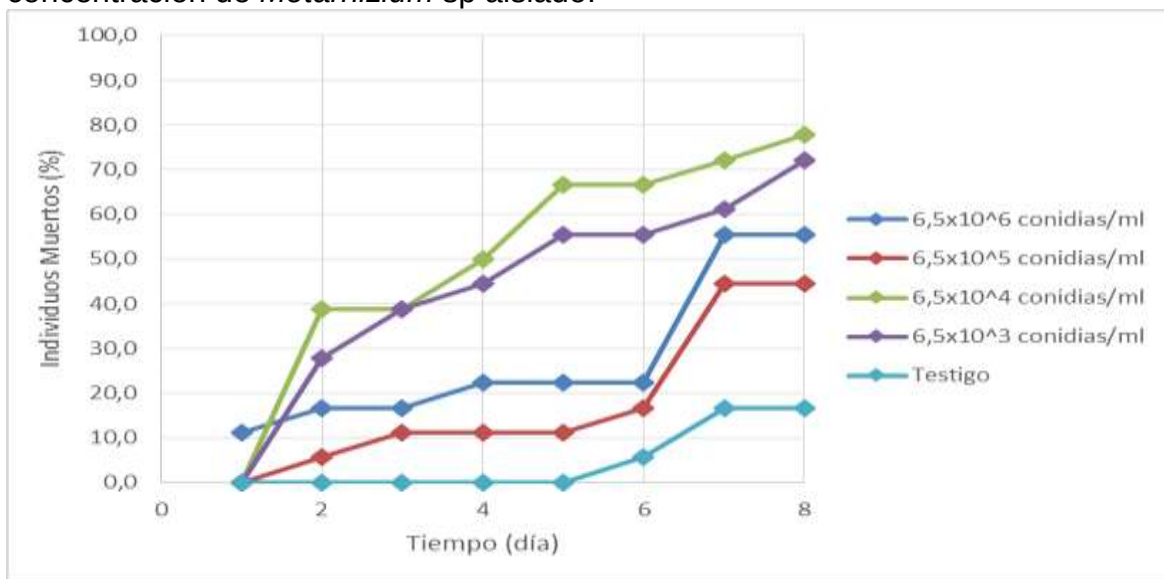
resto de ensayo, sin embargo, el área bajo la curva de estas no es mayor a la curva correspondiente a la concentración de $6,9 \times 10^4$ conidias/ml por lo tanto, esta concentración tiene mayor respuesta en el tiempo llegando a ser más eficaz en este subgrupo de resultados. Por otra parte, entre las cepas comercial y aislada de *Beauveria* sp, la cepa comercial es la que presenta el mejor resultado ya que hubo una mejor respuesta con menor concentración lo cual está respaldado por el área bajo la curva de ambas, lo cual representa su efectividad ante la mortandad de individuos.

Gráfica 7. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de *Beauveria* sp comercial.



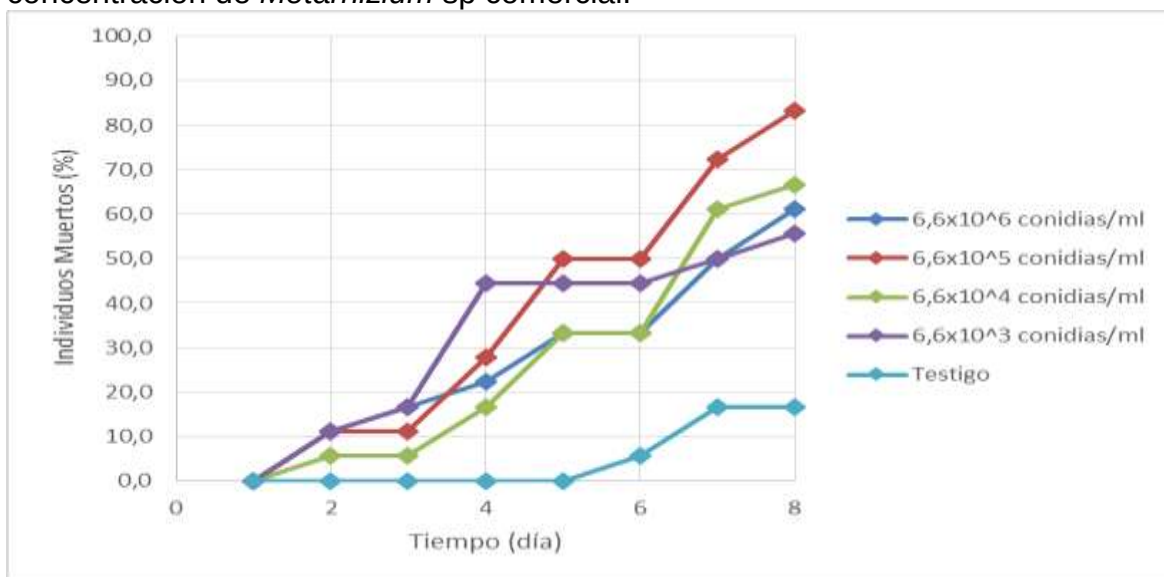
La concentración de mayor respuesta dentro de este subgrupo de resultados es de $6,5 \times 10^4$ conidias/ml por su pronunciada pendiente al inicio del ensayo y su continuo aumento del porcentaje de individuos muertos (Gráfica 8), obteniendo 38,9% en las primeras 48 horas y el máximo porcentaje de muertos al final del ensayo, además se evidencia que para esta cepa de hongo las concentraciones mayores no obtuvieron los mayores resultados mientras que las otras dos concentraciones menores si se obtuvieron los mayores porcentajes evidenciando su efectividad siendo las concentraciones de $6,5 \times 10^3$ y $6,5 \times 10^4$ conidias/ml con tendencia a un comportamiento similar a lo largo del ensayo.

Gráfica 8. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de *Metarhizium* sp aislado.



En la Gráfica 9 se evidencia que la concentración de $6,6 \times 10^5$ conidias/ml presenta mejores resultados alcanzando un porcentaje de 83,3% al final del ensayo, adicionalmente el tratamiento con concentración de $6,6 \times 10^3$ conidias/ml en la mitad del periodo del ensayo tiene mayor porcentaje de individuos muertos, siendo la segunda concentración con mejores resultados, sin embargo, la tendencia del tratamiento de $6,6 \times 10^5$ conidias/ml hizo que tuviera mayor porcentaje de mortalidad. Por otro lado, la concentración de $6,6 \times 10^5$ conidias/ml de esta cepa de hongo fue la concentración que alcanzó mayor mortalidad acumulada entre todos los subgrupos de este ensayo anteriormente descritos.

Gráfica 9. Porcentaje de mortalidad en el tiempo de acuerdo a la variación de la concentración de *Metarhizium* sp comercial.



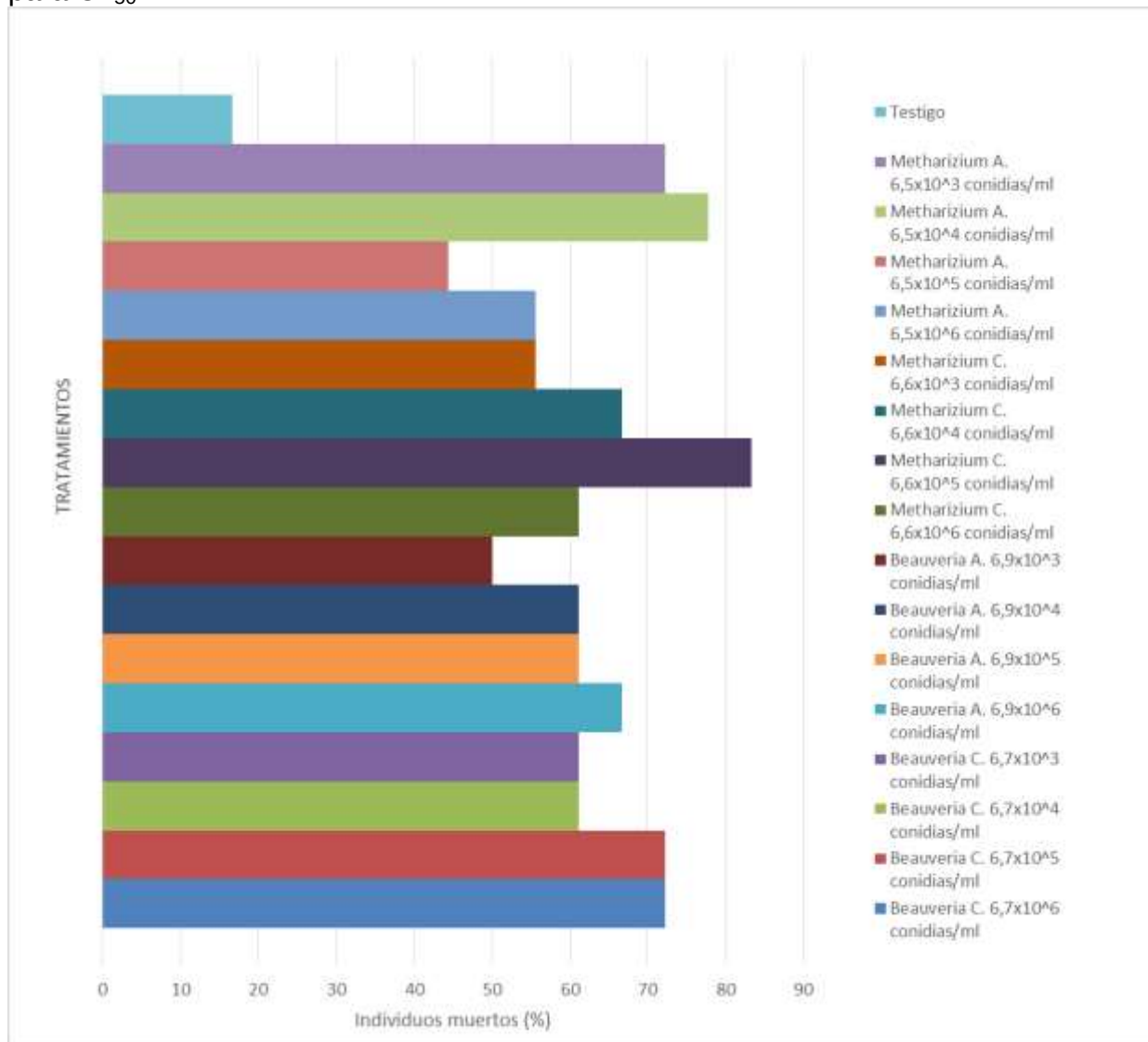
Como se evidencia en la Gráfica 10 del final del ensayo para hallar la CL₅₀, más del 80% de los tratamientos obtuvieron resultados de mortandad mayores al 50%, donde los dos peores resultados del ensayo pertenecieron a las cepas aisladas de *Metarhizium* sp y *Beauveria* sp; mientras que la mejor perteneció a la cepa comercial de *Metarhizium* sp; pero de igual manera hubieron dos tratamientos de *Metarhizium* sp aislado y dos *Beauveria* sp comercial que superaron el 70% del porcentaje de individuos muertos.

La literatura muestra que el comportamiento del hongo *Metarhizium* sp aislado ante la infección a insectos plaga tiende a ser proporcional la concentración y la mortalidad, sin embargo, en el proceso de este trabajo el *Metarhizium* sp aislado se comportó de manera contraria dando mayor porcentaje de individuos muertos a concentraciones bajas que con concentraciones altas, teniendo en cuenta que se evaluaron las mismas concentraciones en la investigación realizada por Mena [66] y las concentraciones de la presente investigación, no obstante lo anterior puede ser debido al tipo de insecto y sus características, o al tipo de cutícula que permita el acceso de este en el interior para su posterior infección [41]. Por otro lado, para la *Beauveria* sp se demuestra de acuerdo a la literatura que de igual manera a mayor concentración del hongo mayor es su mortalidad a lo que el ensayo demostró tender a ese comportamiento, aunque las concentraciones con mayores mortalidades pertenecieron a las concentraciones de $6,7 \times 10^4$ conidias/ml para comercial y $6,9 \times 10^5$ conidias/ml para aisladas [67].

En otro orden de ideas, tal y como se evidencio en el ensayo el *Metarhizium* sp fue más efectivo y virulento que la *Beauveria* sp, como lo es descrito en la literatura encontrada al aplicarlo en larvas de *Ae. aegypti* y que de igual manera cumple con el mismo principio de a mayor concentración mayor es el resultado del porcentaje de mortandad a lo cual concluyó que el tiempo no es un factor dependiente como si lo es la cantidad de conidias que afectan la larva, no obstante, los signos físicos que se presentaron durante el ensayo de las larvas concordaron con la investigación realizada por Alcalde et. al. [68] donde los individuos presentaron separación de la cabeza y el tórax, flacidez del cuerpo larval y cambio de color del tegumento, siendo todo esto a causa de la desintegración de tejidos y cambios de pH de la hemolinfa; por otro lado, la baja mortandad por parte de la *Beauveria* sp se puede deber a que esta tiene un lento crecimiento vegetativo asociado con la liberación lenta de endotoxinas¹⁵ dentro del cuerpo larval, disminuyendo así el porcentaje de mortalidad con respecto al *Metarhizium* sp que presenta un crecimiento vegetativo rápido, teniendo en cuenta que las endotoxinas son estrategias inmunosupresoras del hongo, desarrollados ante los mecanismos supresores del sistema inmune del insecto [62, 63].

¹⁵ Parcialmente constituida por lipopolisacáridos, molécula híbrida que contiene al lípido A en un extremo de la misma y a la cadena polisacáridica en el otro [80]

Gráfica 10. Porcentaje de mortalidad al octavo día de los tratamientos evaluados para CL₅₀.



De acuerdo a la significancia, análisis por Tukey y a los subconjuntos homogéneos como puede observar en el Anexo F, se demostró estadísticamente que hay confianza de las pruebas ya que el único tratamiento con comportamiento contrario es el testigo (T17) por lo que se demuestra que los hongos entomopatógenos tuvieron incidencia en el ensayo y no las condiciones base. Es decir, todos los tratamientos son diferentes al testigo, por lo que se puede deducir que la mortalidad se debe a la aplicación del patógeno y no a las condiciones del experimento.

Usando el programa ProStat se determinó la CL₅₀ para cada uno de los hongos evaluados tomando el número de muertos registrados al final del ensayo con cada concentración y sus respectivas replicas, dando como resultado los datos de la Tabla 7, adicionalmente se puede observar la memoria de cálculo determinada por el programa en el Anexo G.

Tabla 7. Concentración letal 50 para cada hongo entomopatogeno evaluado.

Hongo Entomopatógeno	CL ₅₀ (conidias/ml)
<i>Beauveria</i> sp Comercial	3x10 ³
<i>Beauveria</i> sp Aislada	5x10 ⁴
<i>Metarhizium</i> sp Aislado	6x10 ⁵
<i>Metarhizium</i> sp Comercial	6x10 ²

De lo anterior, se infiere que las cepas de *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp comerciales son las que obtuvieron mayor respuesta en cuanto al porcentaje de mortalidad debido a que estas presentan una menor CL₅₀ a los 8 días de haber iniciado el ensayo, generando un mayor impacto en un periodo más corto en comparación a las demás, principalmente la cepa de *Metarhizium* sp comercial que presento el menor valor, al contrario de lo que sucede con el *Metarhizium* sp aislado que alcanza el mayor valor de la CL₅₀ generando que su efecto se presente en un mayor tiempo; de igual manera sucede lo mismo con las concentraciones de conidias de *Beauveria* sp en cuanto que hay mayor concentración en las cepas aisladas que en las comerciales.

Lo cual se puede deber a que los hongos de procedencia comercial tienen una mayor especificidad al momento de ser expuestos al insecto plaga ya que al ser empacados debieron ser activados previamente en el laboratorio y anteriormente estar solamente expuestos a insectos, mientras que los hongos aislados provenientes del laboratorio de la USTA son hongos que estuvieron almacenados a bajas temperaturas con el fin de inhibir su esporulación, además en el inicio de esta investigación, el hongo fue producto de varios reaislamientos en el medio PDA generando que este tenga menor eficacia al enfrentarse a insectos plaga debido a que este se encuentra enriquecido de los nutrientes necesarios para mantener su desarrollo, generando que su búsqueda por extenderse se hiciera menos necesaria.

6. Impacto social y ambiental:

Con el presente trabajo de grado, se pretende generar información que contribuya al posterior desarrollo de alternativas a los plaguicidas químicos por medio de un control biológico para la plaga *Tecia solanivora* puesto que la principal solución empleada actualmente, es el uso de plaguicidas sintéticos, los cuales traen consigo numerosos impactos ambientales negativos. Dentro de estos impactos se encuentra a corto plazo la afectación directa sobre el medio abiótico (suelo, aire, agua) y el medio biótico, junto con la muerte o enfermedad de otros organismos sensibles al producto que no hacen parte de la plaga que se quiere controlar. Dentro de las problemáticas más importantes a largo plazo se encuentra la persistencia del plaguicida, que trae consigo un efecto sobre las cadenas tróficas, en procesos de bioacumulación y biomagnificación [2].

Al desarrollar tecnologías basadas en insumos biológicos se busca la reducción del daño de las plagas, la mejora de la salud ambiental de los cultivos agrícolas junto con la reducción del riesgo para la salud humana. Los productores y consumidores, pueden verse afectados por los plaguicidas en dos aspectos diferentes, la toxicidad crónica derivada de una prolongada exposición a dosis muy bajas de uno o varios de estos productos sintéticos y en los consumidores provocada generalmente por la ingestión de alimentos que los contienen. Por otro lado, la toxicidad aguda que afecta principalmente a los productores, es causada accidentalmente en su manipulación o aplicación, en donde se debe de tener en cuenta que existen adversidades a corto y largo plazo dependiendo de la toxicidad del elemento de estudio (plaguicida), su naturaleza, la dosis y la respuesta del organismo [70].

Adicionalmente, se encuentran los beneficios económicos de los bioplaguicidas frente a los plaguicidas sintéticos, en donde se ha demostrado un mayor costo-beneficio; como por ejemplo, el Informe de seguimiento técnico de los proyectos financiados por FONTAGRO (2001), el control de plagas para el cultivo de melón mediante el uso de bioplaguicidas se determinó 1.9% de rentabilidad contra el 1.6% para el tratamiento con plaguicidas sintéticos, es por esto que se ha incrementado el porcentaje anual del uso de bioplaguicidas en un 9%, mientras que el uso de los plaguicidas sintéticos ha decrecido en un -1.5% [71] [72]

7. Conclusiones

A partir del trabajo realizado se logró dar respuesta a los objetivos planteados hallando así la CL_{50} para las cuatro cepas de hongo evaluadas, por lo que se determinó que la cepa de *Metarhizium* sp comercial con concentración letal media 6×10^2 fue la de mayor eficacia.

Como se observó, el método por inmersión generó mayor mortalidad durante el ensayo, además el tensoactivo (Tween 80) mostro ser un factor determinante para generar una mayor velocidad de infección en ambos métodos (aspersión e inmersión) donde se logró una alta respuesta en menor tiempo, debido a que este permitió una mejor adherencia del hongo al tegumento del insecto.

Las especies tratadas en el proyecto junto con las condiciones que se manejaron para su crianza facilitaron el manejo de las mismas principalmente por su actividad nocturna haciendo que éstas en el día se comportaran de manera más pasiva.

Los hongos entomopatógenos aislados en los laboratorios de la USTA presentan mayor CL_{50} para ambos casos, determinando que entre mayor es el número de reaislamientos, este pierde su efectividad sobre los individuos al no ser previamente activados, generando cambios en los resultados respecto a la literatura encontrada.

La baja mortandad por parte de la *Beauveria* sp determinada en la presente investigación, se debe a que este hongo presenta un lento crecimiento vegetativo asociado con la liberación lenta de endotoxinas dentro del cuerpo larval, disminuyendo así el porcentaje de mortalidad con respecto al *Metarhizium* sp que presenta un crecimiento vegetativo rápido; sin embargo, la relación dosis-respuesta esperada no se vio reflejada principalmente en la cepa de *Metarhizium* sp aislado, la cual presentó la concentración letal media más alta entre las cuatro cepas de estudio.

Dentro de lo observado, se determinó que el hongo al hacer contacto con el insecto lo infecta hasta su deceso, haciendo que el huésped mantenga una atmosfera húmeda asegurando la esporulación del hongo, y así invadir los demás individuos presentes; las condiciones ambientales necesarias para que el hongo siga su proceso de esporulación son similares a las condiciones ambientales en donde la especie de *Tecia solanivora* reside, facilitando y asegurando que el ciclo de vida del hongo continúe.

Se observaron cambios físicos en los individuos tales como separación de la cabeza y el tórax, flacidez del cuerpo larval y cambio de color del tegumento a

color negro, lo cual fue soportado con base a una revisión bibliográfica determinando que se debía a la desintegración de tejidos y cambios de pH de la hemolinfa como efecto del hongo sobre el insecto.

Para una mayor esporulación de los hongos se evidenció que a menor disponibilidad del alimento (PDA) el hongo se estresa generando así mayor cantidad de conidias en busca de su supervivencia facilitando la obtención de la misma en los desarrollo de los bioensayos.

8.Recomendaciones

Teniendo en cuenta que los hongos con mayor número de reaislamientos tienen menor capacidad de respuesta ante el contacto con el macroinvertebrado, se recomienda realizar un agar a base de sustrato biológico que evite esta pérdida de capacidad por parte del hongo entomopatógeno.

Se debe tener en cuenta que estas pruebas fueron hechas para un ambiente controlado en laboratorio y aunque son extrapolables, se recomienda repetir los ensayos en campo con mayores proporciones con base en los resultados del presente estudio.

Para el desarrollo de los bioensayos con *Galleria mellonella* se recomienda utilizar recipientes de vidrio ya que estos también se alimentan de tela por su composición natural provocando que estos se salgan, y por lo tanto hace que las pruebas no sean válidas ya que no se garantiza las condiciones ni la supervivencia de los mismos.

Se recomienda mantener las condiciones de asepsia de laboratorio en el manejo de los hongos garantizando un menor número de reaislamientos y por ende menor tiempo en obtener el hongo puro.

Para las futuras investigaciones en las que se utilicen hongos entomopatógenos que han sido previamente aislados, se recomienda activarlos con el hospedero antes de iniciar los ensayos para obtener mayor eficacia en los resultados.

9. Bibliografía

- [1] Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA), «Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades,» Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA), República Dominicana, 2004.
- [2] D. Yanggen, C. Crissman y P. Espinosa, «Plaguicidas, salud y productividad de los agricultores,» de *Los plaguicidas: impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador*, Ecuador, Abya Yala, 2003, pp. 135 - 145.
- [3] DANE, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, «El cultivo de la papa, *Solanum tuberosum*, alimento de gran valor nutritivo, clave en la seguridad alimentaria mundial,» SIPSA, Bogotá D.C., 2013.
- [4] Corpoica, «Manual integrado de la polilla Guatemalteca de la papa *Tecia Solanivora*,» PRONATTA, Bogotá D.C., 1999.
- [5] Instituto Agropecuario Colombiano, «Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena y *S. phureja*), Medidas para la temporada invernal,» Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá D.C., 2011.
- [6] J. E. Ramírez, M. I. Gómez, J. M. Cotes y C. E. Núñez, «Insecticidal effect of labiate essential oils on *Tecia solanivora* Povolny in laboratory,» *Agronomía Colombiana*, vol. 28, nº 2, 2010.
- [7] A. D. Karina Benítez, Prospección de patógenos con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*, FAM gelechiidae), Bogotá D.C.: Tesis de grado, 2016.
- [8] División de producción y protección vegetal de la FAO, Tesoro enterrado, Roma, 2008.
- [9] FAO, *Las papas, la nutrición y la alimentación*, Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2008.
- [10] Superintendencia de Industria y Comercio, *Cadena productiva de la papa: diagnóstico de libre competencia*, Bogotá D.C.: Plan Nacional de Desarrollo, 2012.
- [11] H. Villareal, D. Porras, A. Santa, J. Lagoeyte y D. Muñoz, *Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia*, Bogotá D.C.: Federación Colombiana de productores de papa (FEDEPAPA), 2007.

- [12] FEDEPAPA, Recopilación de la investigación del sistema productivo papa criolla, Bogotá D.C.: Gobernación de Cundinamarca, 2010.
- [13] SENA, Manejo integrado de plagas del café, Manizales : Cenicafe, 2005.
- [14] D. R. Mesa, INFORME “La polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*) en Tenerife”, Tenerife, 2012.
- [15] Cs Canarias, «Cs Canarias pregunta al Gobierno de España las razones por las que excluye a Canarias del programa nacional destinado al control y a la erradicación de la polilla guatemalteca en las papas,» 15 Marzo 2017. [En línea]. Available: <http://canarias.ciudadanos-cs.org/2017/03/15/cs-pregunta-al-gobierno-de-espana-las-razones-por-las-que-excluye-a-canarias-del-programa-nacional-destinado-al-control-y-a-la-erradicacion-de-la-polilla-guatemalteca-en-las-papas/>.
- [16] DANE ; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, «Polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), plaga de gran impacto económico en el cultivo de la papa.,» SIPSA, Bogotá D.C., 2014.
- [17] P. E. Cuartas, Evaluación del desarrollo de la infección y del efecto de la formulación de aislamiento de granulovirus sobre *Tecia solanivora* (Povolny) y *Phthorimaea operculella*, Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- [18] INIA - Chile, «Instituto de Investigaciones Agropecuarias,» Julio 2016. [En línea]. Available: <http://manualinia.papachile.cl/?page=consumo&ctn=66>. [Último acceso: Agosto 2016].
- [19] Fedepapa, Gobernación de Cundinamarca, «Fedepapa,» 2010. [En línea]. Available: <http://jovenesrurales.minagricultura.gov.co/documents/10180/160303/Plagas+y+enfermedades+de+la+papa-Investigaci%C3%B3n/0a3abf4d-a4db-4be2-ae50-d86db3c8d2ec>. [Último acceso: 2017].
- [20] R. Guitart, TÓXICOS Los Enemigos de la Vida, Barcelona: Servei de Publicacions de la Universitat , 2014.
- [21] D. d. S. y. S. H. d. I. EE.UU, «CLORPIRIFOS,» ATSDR, Servicio de Salud Pública Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 1997.
- [22] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Documentación Límites Exposición Profesional, «Documentación Toxicológica para el Establecimiento del Límite de Exposición Profesional del Carbaril,» DLEP , 2017.
- [23] Ediciones Agrotécnicas SL, «Terralia,» 2017. [En línea]. Available: https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/view_composition?composition_id=12830. [Último acceso: 2017].

- [24] Antalien Agro Químicos, «Antalien,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.antalien.net/modulos/productos/archivos/b92c7fafc98ee58921f9a66096e9d27e.pdf>. [Último acceso: 2017].
- [25] S. P. Eugenia Trujillo, «Polilla Guatemalteca de la papa. Identificación y control,» 2011.
- [26] Instituto Colombiano Agropecuario, «Estadísticas de comercialización de plaguicidas químicos de uso agrícola 2015,» Produmedios, Bogotá, 2016.
- [27] QUIMINET, «QN,» Abril 2017. [En línea]. Available: <https://www.quiminet.com>. [Último acceso: 2017].
- [28] D. Fischbein, Introducción a la teoría del control biológico de plagas, San Carlos de Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2012.
- [29] Centro Internacional de la Papa, Primer seminario taller internacional sobre manejo integrado de Teca solanivora, INIAP Archivo Historico.
- [30] E. Cano, C. Carballo y F. Guharay, Control biológico de plagas agrícolas, Bib. Orton IICA, 2004.
- [31] J. Pell, J. Eilenberg, A. Hajek y D. Steinkraus, «Biology, Ecology and Management Potential Entomophthorales Pest,» de *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, Reino Unido, CAB Internacional, 2001, pp. 71 - 154.
- [32] R. Alzugaray, M. S. Zerbino, S. Stewart, A. Ribeiro y J. Eilenberg, «Epizootiología de hongos Entomophthorales. Uso de Zoophthora radicans (Brefeld) Batko (Zygomicotina: Entomophthorales) para el control de Epinotia aporema (Wals.) (Lepidoptera:Tortricidae) en Uruguay.,» *Revista Social Entomologica Argentina*, pp. 307-311, 1999.
- [33] J. A. Badii M. H., «Biological control a sustainable way of pest control,» *International Journal of Good Conscience*, pp. 82-89, 2006.
- [34] C. Z. Salvador, «Uso de Metarhizium anisopliae para el control biológico del salivazo (Aeneolamia spp. y Prosapia spp.),» de *pastizales de Brachiaria decumbens en El Petén, Guatemala*, Costa Rica, CATIE, 2006.
- [35] Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria ; SAGAR, «Uso de Beauveria bassiana como insecticida microbial,» Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Tecmán, 1999.
- [36] J. A. Acosta, Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de Scutigerella immaculata, Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- [37] A. Téllez , M. Cruz, Y. Flores, A. Torres y A. Arana, «Mecanismos de acción y respuesta en la

relación de hongos entomopatógenos e insectos,» *Revista mexicana de micología*, vol. 30, nº 1, pp. 73 - 80 , 2009.

- [38] M. Pucheta Díaz, A. Flores Macías, S. Rodríguez Navarro y M. de la Torre, «Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos,» *INTERCIENCIA*, vol. 31, nº 12, pp. 856 - 860, 2006.
- [39] H. Chiriboga, G. Gómez y K. Garcés, *Beauveria Bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras, Paraguay: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura , 2015.
- [40] M. C. C. d. García, S. R. Restrepo, A. E. Franco-Molano, M. C. Toquica y N. V. Estupiñan, *Biología de Hongos*, Bogotá: Ediciones Uniandes, 2012.
- [41] S. B. V. Ramírez, «Particularidades bioecológicas de *Mahanarva Andigena* (Jacobi) como base para el manejo con *Metarhizium Anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en la caña de azúcar *Saccharum* spp. híbrido en Pastaza, Ecuador,» Editorial Universitaria, Ciudad de La Habana, 2015.
- [42] M. B. Tene, Efecto de *Metharizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en el ganado bovino estabulado, Tecmán: Universidad de Colima, 2002.
- [43] J. M. Patricia Gómez, «Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*,» Guayas, 2004.
- [44] M. I. L. Villas, El ciclo biológico de la polilla grande de la cera *Galleria mellonella*., España, 2006.
- [45] M. P. Álvarez y A. B. Cañamero, «Funcionalidad del órgano timpánico de *Urania boisduvii* (Lepidoptera: Geometroidea: Uraniidae) y su posible importancia conductual,» *Revista Cubana Ciencias Biológicas*, vol. 3, nº 1, pp. 81-94, 2014.
- [46] M. Elías-Santos, Introducción de la cría masiva de *Galleria mellonella* para el aislamiento de hongos entomopatógenos y reproducción de nematodos, Monterrey Nuevo León: Universidad de Mexico.
- [47] M. Villas, El ciclo biológico de la polilla grande de la cera *Galleria mellonella*.
- [48] J. C Smart, «Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects,» *Supplement to the Journal of Nematology*, vol. 27, nº 4S, pp. 529-534, 1995.
- [49] Lecuona, Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga, Argentina, 1996.

- [50] C. I. N. Estrada, «Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico,» Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, 2008.
- [51] F. Xuenjuan, A. Maggiorani y S. Guñido, «Uso de nemátodos entomopatógenos como una alternativa en el control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Mérida-Venezuela,» *Forest*, vol. 44, pp. 115-118, 2000.
- [52] L. Pazos, A. Rojas y A. C. Giraldo, «Actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* sobre la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae),» *Revista Mutis*, vol. 3, pp. 31-42, 2013.
- [53] K. Benótez y A. Duarte, Prospección de patógenos con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*, FAM gelechiidae), Bogotá D.C: Tesis de grado, 2016.
- [54] M. Repetto y G. Repetto, Toxicología fundamental, Sevilla: Ediciones Díaz de Santos, 2009.
- [55] C. Gamez y E. Ramirez, Determinación de la concentración letal media del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*, Bogotá D.C.: Universidad de la Salle, 2008.
- [56] A. R. González, Ecología aplicada: diseño y análisis estadístico, Bogotá D.C.: Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2000.
- [57] Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA), Producción y uso de hongos entomopatógenos, Managua: CATIE.
- [58] D. Rinconb y J. García, «Frecuencia de cópula de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae),» *Revista Colombiana de Entomología*, vol. 33, nº 2, pp. 133-140, 2007.
- [59] B. Echeverría, Determinacion de parametros tecnicos para la crianza masiva de la polilla de la papa (*Tecia solanivora*, Povolny) en la provincia del Carchi con proyección a la producción de Baculovirus, Ecuador, 2006.
- [60] F. J. Realpe, A. E. Bustillo y J. C. López, Optimización de la cría de *Galleria mellonella* para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café, Bogotá D.C.: CENICAFE, 2007.
- [61] O. Bastidas, «Celeromics,» [En línea]. Available: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>. [Último acceso: Septiembre 2017].

- [62] L. M. Soto y C. M. García, «METODOLOGY TO EVALUATE THE INSECTICIDAL POTENCIAL OF FOREST TREE SPECIES,» *Revista de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín*, vol. 53, nº 1, pp. 787-799, 2000.
- [63] K. Benítez y A. Duarte, Prospección de patógenos con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*, FAM gelechiidae), Bogotá D.C: Tesis de grado, 2016.
- [64] G. Hoog, «The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium*,» *Studies in Mycology*, vol. 1, nº 1, pp. 1-41, 1972.
- [65] C. Góngora, P. Marín y P. Benavides, Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café, Caldas: CENICAFE; Fondo Nacional del Café, 2009.
- [66] S. V. Mena Cordoba, «EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE LA HORMIGA ARRIERA *Atta colombica* (G) DEL MUNICIPIO DE LLORÓ - CHOCÓ,» Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011.
- [67] M. Hafez, F. N. Zaki, A. Moursy y M. Sabbour, «BIOLOGICAL EFFECTS OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS, *BEAUVERIA BASSIANA* ON THE POTATO TUBER MOTH *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* (SELLER),» *Journal of Islamic Academy of Sciences*, vol. 7, nº 4, pp. 211-214, 1994.
- [68] J. G. Alcalde Mosqueira, J. E. Roldán Rodríguez, V. d. P. Savia Cueva y L. Collantes Silva, «Efecto Biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* ccb-le302 y *Beauveria Bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes Aegypti*,» *UCV - SCIENTIA*, vol. 6, nº 1, pp. 33-41, 2014.
- [69] M. B. Nájera-Rincón, M. García Martínez, R. L. Crocker, V. Hernández Velázquez y L. A. Rodríguez del Bosque, «Virulencia de *beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio,» *Fitosanidad*, vol. 9, nº 1, pp. 33-36, 2005.
- [70] R. S. Benítez, Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte, Mexico, 2012.
- [71] FONTAGRO, «Desarrollo de micoinsecticidas para el manejo integrado de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en cultivos frutales y hortícolas, en zonas neotropicales,» FONTAGRO, Washington DC, 2001.
- [72] L. A. G. Franco, «Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México,» Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 2012.
- [73] G. R. Toro, Glosario ilustrado de dermatología y dermatopatología, vol. 13, Bogotá D.C.: Univ.

Nacional de Colombia, 2004, p. 152.

- [74] J. P. P. J. M. N. M. M. d. I. R. F. M. de la Rosa Fraile, Microbiología en ciencias de la salud : conceptos y aplicaciones, Elsevier España, 2011.
- [75] F. A. L. Carrasco, «Producción de papa temprana en la comuna de Maullín, Xª Región: Propuesta y esvaluación de un manejo agronómico,» Chile, 2007.
- [76] E. M. Monteresino y M. M. de Brewer, Diccionario entomológico, Univ Nacional de Río Cuarto, 2001.
- [77] S. C. García, Anuario de historia, Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2006.
- [78] M. Ulloa, C. Torriello y T. Mier, Hongos microscópicos saprobios y parásitos, México DF: UNAM, 2002.
- [79] T. Herrera, M. Ulloa y M. Ruiz, El reino de los hongos: micología básica y aplicada., México DF: Universidad Nacional Atónoma de México, 2009.
- [80] C. A. I. John L. Ingraham, Introducción a la microbiología, Reverte, 1998.
- [81] Real Academia Española, «Real Academia Española,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.rae.es/>. [Último acceso: Enero 2018].
- [82] A. Cruz y B. Camargo, Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines, México D.F: UNAM, 2001.

A. Anexo: memoria de cálculo para la determinación del método de infección.

Anexo A. Memoria de cálculo

Con el fin de determinar el método de infección fue necesario hallar las concentraciones de conidias realizando las siguientes ecuaciones a partir de la metodología de conteo celular para la cámara de Neubauer explicado en el capítulo 6 por cada hongo evaluado.

- *Metarhizium sp.* aislado + Tween 80

$$[] = \frac{329 \times 10.000}{5} = 6,6 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Metarhizium sp.* aislado + Agua destilada

$$[] = \frac{306 \times 10.000}{5} = 6,1 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Metarhizium sp.* comercial + Tween 80

$$[] = \frac{337 \times 10.000}{5} = 6,7 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Metarhizium sp.* comercial + Agua destilada

$$[] = \frac{305 \times 10.000}{5} = 6,1 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* aislada + Tween 80

$$[] = \frac{311 \times 10.000}{5} = 6,2 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* aislada + Agua destilada

$$[] = \frac{334 \times 10.000}{5} = 6,7 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* comercial + Tween 80

$$[] = \frac{319 \times 10.000}{5} = 6,4 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* comercial + Agua destilada

$$[] = \frac{323 \times 10.000}{5} = 6,5 \times 10^5 \text{ conidias/ml}$$

B. Anexo: registro de las pruebas sobre galleria mellonella

Figura B-1. Registro de mortalidad

Tratamiento	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384	408	432
1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1
3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4.4	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1
5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
6.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2
6.4	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8.1	-	-	-	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8.2	-	-	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
8.3	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
8.4	-	-	-	-	-	2	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
8.5	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
9.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	2
9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10.1	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10.2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tratamiento	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384	408	432
11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
11.3	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11.4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
11.5	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
12.1	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12.3	-	-	-	-	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
12.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	2	2	2	2
13.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
14.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
15.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
16.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
16.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.4	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2
17.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
18.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1
20.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2
20.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C. Anexo: resultados estadísticos para la determinación del método de infección.

Figura C-1. Áreas bajo la curva.

	Áreas (unidades cuadradas)
T5	900
T6	3000
T7	1020
T8	18120
T9	1740
T10	6660
T11	7020
T12	7140
T13	1860
T14	2100
T15	1320
T16	2100
T17	1020
T18	60
T19	3060
T20	4380

Figura C-2. ANOVA de un factor

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo
					Límite inferior	Límite superior	
1,0	5	,00	,000	,000	,00	,00	0
2,0	5	60,00	134,164	60,000	-106,59	226,59	0
3,0	5	1680,00	2310,195	1033,151	-1188,49	4548,49	0
4,0	5	3780,00	5356,491	2395,496	-2870,96	10430,96	0
5,0	5	900,00	2012,461	900,000	-1598,80	3398,80	0
6,0	5	3000,00	4074,923	1822,361	-2059,69	8059,69	0
7,0	5	1020,00	2280,789	1020,000	-1811,97	3851,97	0
8,0	5	18120,00	7758,350	3469,640	8486,74	27753,26	10200
9,0	5	1740,00	2440,901	1091,604	-1290,78	4770,78	0

10,0	5	6660,00	7125,868	3186,785	-2187,93	15507,93	0
11,0	5	7020,00	4197,857	1877,339	1807,67	12232,33	0
12,0	5	7140,00	5253,856	2349,596	616,48	13663,52	0
13,0	5	1860,00	3383,489	1513,142	-2341,16	6061,16	0
14,0	5	2100,00	2741,350	1225,969	-1303,84	5503,84	0
15,0	5	1320,00	2210,656	988,635	-1424,89	4064,89	0
16,0	5	2460,00	3309,532	1480,068	-1649,33	6569,33	0
17,0	5	1020,00	2280,789	1020,000	-1811,97	3851,97	0
18,0	5	60,00	134,164	60,000	-106,59	226,59	0
19,0	5	3060,00	2793,385	1249,240	-408,45	6528,45	0
20,0	5	4380,00	2834,960	1267,833	859,93	7900,07	0
Total	100	3369,00	5244,192	524,419	2328,44	4409,56	0

Figura C-3. Estadísticos descriptivos

	Máximo
1,0	0
2,0	300
3,0	4500
4,0	11400
5,0	4500
6,0	9900
7,0	5100
8,0	27000

9,0	5100
10,0	16200
11,0	10800
12,0	14400
13,0	7800
14,0	5100
15,0	5100
16,0	7500
17,0	5100
18,0	300
19,0	5100
20,0	7800
Total	27000

Figura C-4. Significancia de los datos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1610973900,0 00	19	84788100,000	6,102	,000
Intra-grupos	1111680000,0 00	80	13896000,000		
Total	2722653900,0 00	99			

Figura C-5. Comparaciones múltiples.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Area

Pruebas post hoc

HSD de Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,0	2,0	-60,000	2357,626	1,000	-8701,28	8581,28
	3,0	-1680,000	2357,626	1,000	-10321,28	6961,28
	4,0	-3780,000	2357,626	,986	-12421,28	4861,28
	5,0	-900,000	2357,626	1,000	-9541,28	7741,28
	6,0	-3000,000	2357,626	,999	-11641,28	5641,28
	7,0	-1020,000	2357,626	1,000	-9661,28	7621,28
	8,0	-18120,000 [*]	2357,626	,000	-26761,28	-9478,72
	9,0	-1740,000	2357,626	1,000	-10381,28	6901,28
	10,0	-6660,000	2357,626	,360	-15301,28	1981,28
	11,0	-7020,000	2357,626	,269	-15661,28	1621,28
	12,0	-7140,000	2357,626	,243	-15781,28	1501,28
	13,0	-1860,000	2357,626	1,000	-10501,28	6781,28
	14,0	-2100,000	2357,626	1,000	-10741,28	6541,28
	15,0	-1320,000	2357,626	1,000	-9961,28	7321,28
	16,0	-2460,000	2357,626	1,000	-11101,28	6181,28
	17,0	-1020,000	2357,626	1,000	-9661,28	7621,28
	18,0	-60,000	2357,626	1,000	-8701,28	8581,28

2,0	19,0	-3060,000	2357,626	,999	-11701,28	5581,28
	20,0	-4380,000	2357,626	,941	-13021,28	4261,28
	1,0	60,000	2357,626	1,000	-8581,28	8701,28
	3,0	-1620,000	2357,626	1,000	-10261,28	7021,28
	4,0	-3720,000	2357,626	,988	-12361,28	4921,28
	5,0	-840,000	2357,626	1,000	-9481,28	7801,28
	6,0	-2940,000	2357,626	,999	-11581,28	5701,28
	7,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	8,0	-18060,000*	2357,626	,000	-26701,28	-9418,72
	9,0	-1680,000	2357,626	1,000	-10321,28	6961,28
	10,0	-6600,000	2357,626	,376	-15241,28	2041,28
	11,0	-6960,000	2357,626	,283	-15601,28	1681,28
	12,0	-7080,000	2357,626	,256	-15721,28	1561,28
	13,0	-1800,000	2357,626	1,000	-10441,28	6841,28
	14,0	-2040,000	2357,626	1,000	-10681,28	6601,28
	15,0	-1260,000	2357,626	1,000	-9901,28	7381,28
	16,0	-2400,000	2357,626	1,000	-11041,28	6241,28
	17,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	18,0	,000	2357,626	1,000	-8641,28	8641,28
	19,0	-3000,000	2357,626	,999	-11641,28	5641,28
	20,0	-4320,000	2357,626	,948	-12961,28	4321,28
3,0	1,0	1680,000	2357,626	1,000	-6961,28	10321,28
	2,0	1620,000	2357,626	1,000	-7021,28	10261,28
	4,0	-2100,000	2357,626	1,000	-10741,28	6541,28

	5,0	780,000	2357,626	1,000	-7861,28	9421,28
	6,0	-1320,000	2357,626	1,000	-9961,28	7321,28
	7,0	660,000	2357,626	1,000	-7981,28	9301,28
	8,0	-16440,000*	2357,626	,000	-25081,28	-7798,72
	9,0	-60,000	2357,626	1,000	-8701,28	8581,28
	10,0	-4980,000	2357,626	,841	-13621,28	3661,28
	11,0	-5340,000	2357,626	,751	-13981,28	3301,28
	12,0	-5460,000	2357,626	,718	-14101,28	3181,28
	13,0	-180,000	2357,626	1,000	-8821,28	8461,28
	14,0	-420,000	2357,626	1,000	-9061,28	8221,28
	15,0	360,000	2357,626	1,000	-8281,28	9001,28
	16,0	-780,000	2357,626	1,000	-9421,28	7861,28
	17,0	660,000	2357,626	1,000	-7981,28	9301,28
	18,0	1620,000	2357,626	1,000	-7021,28	10261,28
	19,0	-1380,000	2357,626	1,000	-10021,28	7261,28
	20,0	-2700,000	2357,626	1,000	-11341,28	5941,28
	1,0	3780,000	2357,626	,986	-4861,28	12421,28
	2,0	3720,000	2357,626	,988	-4921,28	12361,28
	3,0	2100,000	2357,626	1,000	-6541,28	10741,28
	5,0	2880,000	2357,626	,999	-5761,28	11521,28
4,0	6,0	780,000	2357,626	1,000	-7861,28	9421,28
	7,0	2760,000	2357,626	1,000	-5881,28	11401,28
	8,0	-14340,000*	2357,626	,000	-22981,28	-5698,72
	9,0	2040,000	2357,626	1,000	-6601,28	10681,28
	10,0	-2880,000	2357,626	,999	-11521,28	5761,28

5,0	11,0	-3240,000	2357,626	,998	-11881,28	5401,28
	12,0	-3360,000	2357,626	,996	-12001,28	5281,28
	13,0	1920,000	2357,626	1,000	-6721,28	10561,28
	14,0	1680,000	2357,626	1,000	-6961,28	10321,28
	15,0	2460,000	2357,626	1,000	-6181,28	11101,28
	16,0	1320,000	2357,626	1,000	-7321,28	9961,28
	17,0	2760,000	2357,626	1,000	-5881,28	11401,28
	18,0	3720,000	2357,626	,988	-4921,28	12361,28
	19,0	720,000	2357,626	1,000	-7921,28	9361,28
	20,0	-600,000	2357,626	1,000	-9241,28	8041,28
	1,0	900,000	2357,626	1,000	-7741,28	9541,28
	2,0	840,000	2357,626	1,000	-7801,28	9481,28
	3,0	-780,000	2357,626	1,000	-9421,28	7861,28
	4,0	-2880,000	2357,626	,999	-11521,28	5761,28
	6,0	-2100,000	2357,626	1,000	-10741,28	6541,28
	7,0	-120,000	2357,626	1,000	-8761,28	8521,28
	8,0	-17220,000*	2357,626	,000	-25861,28	-8578,72
	9,0	-840,000	2357,626	1,000	-9481,28	7801,28
	10,0	-5760,000	2357,626	,629	-14401,28	2881,28
	11,0	-6120,000	2357,626	,517	-14761,28	2521,28
	12,0	-6240,000	2357,626	,481	-14881,28	2401,28
	13,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	14,0	-1200,000	2357,626	1,000	-9841,28	7441,28
	15,0	-420,000	2357,626	1,000	-9061,28	8221,28
	16,0	-1560,000	2357,626	1,000	-10201,28	7081,28

6,0	17,0	-120,000	2357,626	1,000	-8761,28	8521,28
	18,0	840,000	2357,626	1,000	-7801,28	9481,28
	19,0	-2160,000	2357,626	1,000	-10801,28	6481,28
	20,0	-3480,000	2357,626	,994	-12121,28	5161,28
	1,0	3000,000	2357,626	,999	-5641,28	11641,28
	2,0	2940,000	2357,626	,999	-5701,28	11581,28
	3,0	1320,000	2357,626	1,000	-7321,28	9961,28
	4,0	-780,000	2357,626	1,000	-9421,28	7861,28
	5,0	2100,000	2357,626	1,000	-6541,28	10741,28
	7,0	1980,000	2357,626	1,000	-6661,28	10621,28
	8,0	-15120,000*	2357,626	,000	-23761,28	-6478,72
	9,0	1260,000	2357,626	1,000	-7381,28	9901,28
	10,0	-3660,000	2357,626	,990	-12301,28	4981,28
	11,0	-4020,000	2357,626	,974	-12661,28	4621,28
	12,0	-4140,000	2357,626	,965	-12781,28	4501,28
	13,0	1140,000	2357,626	1,000	-7501,28	9781,28
	14,0	900,000	2357,626	1,000	-7741,28	9541,28
	15,0	1680,000	2357,626	1,000	-6961,28	10321,28
	16,0	540,000	2357,626	1,000	-8101,28	9181,28
	17,0	1980,000	2357,626	1,000	-6661,28	10621,28
	18,0	2940,000	2357,626	,999	-5701,28	11581,28
7,0	19,0	-60,000	2357,626	1,000	-8701,28	8581,28
	20,0	-1380,000	2357,626	1,000	-10021,28	7261,28
	1,0	1020,000	2357,626	1,000	-7621,28	9661,28
	2,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28

8,0	3,0	-660,000	2357,626	1,000	-9301,28	7981,28
	4,0	-2760,000	2357,626	1,000	-11401,28	5881,28
	5,0	120,000	2357,626	1,000	-8521,28	8761,28
	6,0	-1980,000	2357,626	1,000	-10621,28	6661,28
	8,0	-17100,000*	2357,626	,000	-25741,28	-8458,72
	9,0	-720,000	2357,626	1,000	-9361,28	7921,28
	10,0	-5640,000	2357,626	,665	-14281,28	3001,28
	11,0	-6000,000	2357,626	,555	-14641,28	2641,28
	12,0	-6120,000	2357,626	,517	-14761,28	2521,28
	13,0	-840,000	2357,626	1,000	-9481,28	7801,28
	14,0	-1080,000	2357,626	1,000	-9721,28	7561,28
	15,0	-300,000	2357,626	1,000	-8941,28	8341,28
	16,0	-1440,000	2357,626	1,000	-10081,28	7201,28
	17,0	,000	2357,626	1,000	-8641,28	8641,28
	18,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28
	19,0	-2040,000	2357,626	1,000	-10681,28	6601,28
	20,0	-3360,000	2357,626	,996	-12001,28	5281,28
	1,0	18120,000*	2357,626	,000	9478,72	26761,28
	2,0	18060,000*	2357,626	,000	9418,72	26701,28
	3,0	16440,000*	2357,626	,000	7798,72	25081,28
	4,0	14340,000*	2357,626	,000	5698,72	22981,28
8,0	5,0	17220,000*	2357,626	,000	8578,72	25861,28
	6,0	15120,000*	2357,626	,000	6478,72	23761,28
	7,0	17100,000*	2357,626	,000	8458,72	25741,28
	9,0	16380,000*	2357,626	,000	7738,72	25021,28

9,0	10,0	11460,000*	2357,626	,001	2818,72	20101,28
	11,0	11100,000*	2357,626	,002	2458,72	19741,28
	12,0	10980,000*	2357,626	,002	2338,72	19621,28
	13,0	16260,000*	2357,626	,000	7618,72	24901,28
	14,0	16020,000*	2357,626	,000	7378,72	24661,28
	15,0	16800,000*	2357,626	,000	8158,72	25441,28
	16,0	15660,000*	2357,626	,000	7018,72	24301,28
	17,0	17100,000*	2357,626	,000	8458,72	25741,28
	18,0	18060,000*	2357,626	,000	9418,72	26701,28
	19,0	15060,000*	2357,626	,000	6418,72	23701,28
	20,0	13740,000*	2357,626	,000	5098,72	22381,28
	1,0	1740,000	2357,626	1,000	-6901,28	10381,28
	2,0	1680,000	2357,626	1,000	-6961,28	10321,28
	3,0	60,000	2357,626	1,000	-8581,28	8701,28
	4,0	-2040,000	2357,626	1,000	-10681,28	6601,28
	5,0	840,000	2357,626	1,000	-7801,28	9481,28
	6,0	-1260,000	2357,626	1,000	-9901,28	7381,28
	7,0	720,000	2357,626	1,000	-7921,28	9361,28
	8,0	-16380,000*	2357,626	,000	-25021,28	-7738,72
	10,0	-4920,000	2357,626	,853	-13561,28	3721,28
	11,0	-5280,000	2357,626	,768	-13921,28	3361,28
	12,0	-5400,000	2357,626	,735	-14041,28	3241,28
	13,0	-120,000	2357,626	1,000	-8761,28	8521,28
	14,0	-360,000	2357,626	1,000	-9001,28	8281,28
	15,0	420,000	2357,626	1,000	-8221,28	9061,28

10,0	16,0	-720,000	2357,626	1,000	-9361,28	7921,28
	17,0	720,000	2357,626	1,000	-7921,28	9361,28
	18,0	1680,000	2357,626	1,000	-6961,28	10321,28
	19,0	-1320,000	2357,626	1,000	-9961,28	7321,28
	20,0	-2640,000	2357,626	1,000	-11281,28	6001,28
	1,0	6660,000	2357,626	,360	-1981,28	15301,28
	2,0	6600,000	2357,626	,376	-2041,28	15241,28
	3,0	4980,000	2357,626	,841	-3661,28	13621,28
	4,0	2880,000	2357,626	,999	-5761,28	11521,28
	5,0	5760,000	2357,626	,629	-2881,28	14401,28
	6,0	3660,000	2357,626	,990	-4981,28	12301,28
	7,0	5640,000	2357,626	,665	-3001,28	14281,28
	8,0	-11460,000*	2357,626	,001	-20101,28	-2818,72
	9,0	4920,000	2357,626	,853	-3721,28	13561,28
	11,0	-360,000	2357,626	1,000	-9001,28	8281,28
	12,0	-480,000	2357,626	1,000	-9121,28	8161,28
	13,0	4800,000	2357,626	,877	-3841,28	13441,28
	14,0	4560,000	2357,626	,918	-4081,28	13201,28
	15,0	5340,000	2357,626	,751	-3301,28	13981,28
	16,0	4200,000	2357,626	,960	-4441,28	12841,28
	17,0	5640,000	2357,626	,665	-3001,28	14281,28
	18,0	6600,000	2357,626	,376	-2041,28	15241,28
	19,0	3600,000	2357,626	,992	-5041,28	12241,28
	20,0	2280,000	2357,626	1,000	-6361,28	10921,28
11,0	1,0	7020,000	2357,626	,269	-1621,28	15661,28

	2,0	6960,000	2357,626	,283	-1681,28	15601,28
	3,0	5340,000	2357,626	,751	-3301,28	13981,28
	4,0	3240,000	2357,626	,998	-5401,28	11881,28
	5,0	6120,000	2357,626	,517	-2521,28	14761,28
	6,0	4020,000	2357,626	,974	-4621,28	12661,28
	7,0	6000,000	2357,626	,555	-2641,28	14641,28
	8,0	-11100,000*	2357,626	,002	-19741,28	-2458,72
	9,0	5280,000	2357,626	,768	-3361,28	13921,28
	10,0	360,000	2357,626	1,000	-8281,28	9001,28
	12,0	-120,000	2357,626	1,000	-8761,28	8521,28
	13,0	5160,000	2357,626	,798	-3481,28	13801,28
	14,0	4920,000	2357,626	,853	-3721,28	13561,28
	15,0	5700,000	2357,626	,647	-2941,28	14341,28
	16,0	4560,000	2357,626	,918	-4081,28	13201,28
	17,0	6000,000	2357,626	,555	-2641,28	14641,28
	18,0	6960,000	2357,626	,283	-1681,28	15601,28
	19,0	3960,000	2357,626	,977	-4681,28	12601,28
	20,0	2640,000	2357,626	1,000	-6001,28	11281,28
	1,0	7140,000	2357,626	,243	-1501,28	15781,28
	2,0	7080,000	2357,626	,256	-1561,28	15721,28
	3,0	5460,000	2357,626	,718	-3181,28	14101,28
12,0	4,0	3360,000	2357,626	,996	-5281,28	12001,28
	5,0	6240,000	2357,626	,481	-2401,28	14881,28
	6,0	4140,000	2357,626	,965	-4501,28	12781,28
	7,0	6120,000	2357,626	,517	-2521,28	14761,28

13,0	8,0	-10980,000*	2357,626	,002	-19621,28	-2338,72
	9,0	5400,000	2357,626	,735	-3241,28	14041,28
	10,0	480,000	2357,626	1,000	-8161,28	9121,28
	11,0	120,000	2357,626	1,000	-8521,28	8761,28
	13,0	5280,000	2357,626	,768	-3361,28	13921,28
	14,0	5040,000	2357,626	,827	-3601,28	13681,28
	15,0	5820,000	2357,626	,610	-2821,28	14461,28
	16,0	4680,000	2357,626	,899	-3961,28	13321,28
	17,0	6120,000	2357,626	,517	-2521,28	14761,28
	18,0	7080,000	2357,626	,256	-1561,28	15721,28
	19,0	4080,000	2357,626	,969	-4561,28	12721,28
	20,0	2760,000	2357,626	1,000	-5881,28	11401,28
	1,0	1860,000	2357,626	1,000	-6781,28	10501,28
	2,0	1800,000	2357,626	1,000	-6841,28	10441,28
	3,0	180,000	2357,626	1,000	-8461,28	8821,28
	4,0	-1920,000	2357,626	1,000	-10561,28	6721,28
	5,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28
	6,0	-1140,000	2357,626	1,000	-9781,28	7501,28
	7,0	840,000	2357,626	1,000	-7801,28	9481,28
	8,0	-16260,000*	2357,626	,000	-24901,28	-7618,72
	9,0	120,000	2357,626	1,000	-8521,28	8761,28
	10,0	-4800,000	2357,626	,877	-13441,28	3841,28
	11,0	-5160,000	2357,626	,798	-13801,28	3481,28
	12,0	-5280,000	2357,626	,768	-13921,28	3361,28
	14,0	-240,000	2357,626	1,000	-8881,28	8401,28

	15,0	540,000	2357,626	1,000	-8101,28	9181,28
	16,0	-600,000	2357,626	1,000	-9241,28	8041,28
	17,0	840,000	2357,626	1,000	-7801,28	9481,28
	18,0	1800,000	2357,626	1,000	-6841,28	10441,28
	19,0	-1200,000	2357,626	1,000	-9841,28	7441,28
	20,0	-2520,000	2357,626	1,000	-11161,28	6121,28
	1,0	2100,000	2357,626	1,000	-6541,28	10741,28
	2,0	2040,000	2357,626	1,000	-6601,28	10681,28
	3,0	420,000	2357,626	1,000	-8221,28	9061,28
	4,0	-1680,000	2357,626	1,000	-10321,28	6961,28
	5,0	1200,000	2357,626	1,000	-7441,28	9841,28
	6,0	-900,000	2357,626	1,000	-9541,28	7741,28
	7,0	1080,000	2357,626	1,000	-7561,28	9721,28
	8,0	-16020,000*	2357,626	,000	-24661,28	-7378,72
	9,0	360,000	2357,626	1,000	-8281,28	9001,28
14,0	10,0	-4560,000	2357,626	,918	-13201,28	4081,28
	11,0	-4920,000	2357,626	,853	-13561,28	3721,28
	12,0	-5040,000	2357,626	,827	-13681,28	3601,28
	13,0	240,000	2357,626	1,000	-8401,28	8881,28
	15,0	780,000	2357,626	1,000	-7861,28	9421,28
	16,0	-360,000	2357,626	1,000	-9001,28	8281,28
	17,0	1080,000	2357,626	1,000	-7561,28	9721,28
	18,0	2040,000	2357,626	1,000	-6601,28	10681,28
	19,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	20,0	-2280,000	2357,626	1,000	-10921,28	6361,28

15,0	1,0	1320,000	2357,626	1,000	-7321,28	9961,28
	2,0	1260,000	2357,626	1,000	-7381,28	9901,28
	3,0	-360,000	2357,626	1,000	-9001,28	8281,28
	4,0	-2460,000	2357,626	1,000	-11101,28	6181,28
	5,0	420,000	2357,626	1,000	-8221,28	9061,28
	6,0	-1680,000	2357,626	1,000	-10321,28	6961,28
	7,0	300,000	2357,626	1,000	-8341,28	8941,28
	8,0	-16800,000*	2357,626	,000	-25441,28	-8158,72
	9,0	-420,000	2357,626	1,000	-9061,28	8221,28
	10,0	-5340,000	2357,626	,751	-13981,28	3301,28
	11,0	-5700,000	2357,626	,647	-14341,28	2941,28
	12,0	-5820,000	2357,626	,610	-14461,28	2821,28
	13,0	-540,000	2357,626	1,000	-9181,28	8101,28
	14,0	-780,000	2357,626	1,000	-9421,28	7861,28
	16,0	-1140,000	2357,626	1,000	-9781,28	7501,28
	17,0	300,000	2357,626	1,000	-8341,28	8941,28
	18,0	1260,000	2357,626	1,000	-7381,28	9901,28
	19,0	-1740,000	2357,626	1,000	-10381,28	6901,28
	20,0	-3060,000	2357,626	,999	-11701,28	5581,28
16,0	1,0	2460,000	2357,626	1,000	-6181,28	11101,28
	2,0	2400,000	2357,626	1,000	-6241,28	11041,28
	3,0	780,000	2357,626	1,000	-7861,28	9421,28
	4,0	-1320,000	2357,626	1,000	-9961,28	7321,28
	5,0	1560,000	2357,626	1,000	-7081,28	10201,28
	6,0	-540,000	2357,626	1,000	-9181,28	8101,28

17,0	7,0	1440,000	2357,626	1,000	-7201,28	10081,28
	8,0	-15660,000*	2357,626	,000	-24301,28	-7018,72
	9,0	720,000	2357,626	1,000	-7921,28	9361,28
	10,0	-4200,000	2357,626	,960	-12841,28	4441,28
	11,0	-4560,000	2357,626	,918	-13201,28	4081,28
	12,0	-4680,000	2357,626	,899	-13321,28	3961,28
	13,0	600,000	2357,626	1,000	-8041,28	9241,28
	14,0	360,000	2357,626	1,000	-8281,28	9001,28
	15,0	1140,000	2357,626	1,000	-7501,28	9781,28
	17,0	1440,000	2357,626	1,000	-7201,28	10081,28
	18,0	2400,000	2357,626	1,000	-6241,28	11041,28
	19,0	-600,000	2357,626	1,000	-9241,28	8041,28
	20,0	-1920,000	2357,626	1,000	-10561,28	6721,28
	1,0	1020,000	2357,626	1,000	-7621,28	9661,28
	2,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28
	3,0	-660,000	2357,626	1,000	-9301,28	7981,28
	4,0	-2760,000	2357,626	1,000	-11401,28	5881,28
	5,0	120,000	2357,626	1,000	-8521,28	8761,28
	6,0	-1980,000	2357,626	1,000	-10621,28	6661,28
	7,0	,000	2357,626	1,000	-8641,28	8641,28
	8,0	-17100,000*	2357,626	,000	-25741,28	-8458,72
	9,0	-720,000	2357,626	1,000	-9361,28	7921,28
	10,0	-5640,000	2357,626	,665	-14281,28	3001,28
	11,0	-6000,000	2357,626	,555	-14641,28	2641,28
	12,0	-6120,000	2357,626	,517	-14761,28	2521,28

18,0	13,0	-840,000	2357,626	1,000	-9481,28	7801,28
	14,0	-1080,000	2357,626	1,000	-9721,28	7561,28
	15,0	-300,000	2357,626	1,000	-8941,28	8341,28
	16,0	-1440,000	2357,626	1,000	-10081,28	7201,28
	18,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28
	19,0	-2040,000	2357,626	1,000	-10681,28	6601,28
	20,0	-3360,000	2357,626	,996	-12001,28	5281,28
	1,0	60,000	2357,626	1,000	-8581,28	8701,28
	2,0	,000	2357,626	1,000	-8641,28	8641,28
	3,0	-1620,000	2357,626	1,000	-10261,28	7021,28
	4,0	-3720,000	2357,626	,988	-12361,28	4921,28
	5,0	-840,000	2357,626	1,000	-9481,28	7801,28
	6,0	-2940,000	2357,626	,999	-11581,28	5701,28
	7,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	8,0	-18060,000*	2357,626	,000	-26701,28	-9418,72
	9,0	-1680,000	2357,626	1,000	-10321,28	6961,28
	10,0	-6600,000	2357,626	,376	-15241,28	2041,28
	11,0	-6960,000	2357,626	,283	-15601,28	1681,28
	12,0	-7080,000	2357,626	,256	-15721,28	1561,28
	13,0	-1800,000	2357,626	1,000	-10441,28	6841,28
	14,0	-2040,000	2357,626	1,000	-10681,28	6601,28
	15,0	-1260,000	2357,626	1,000	-9901,28	7381,28
	16,0	-2400,000	2357,626	1,000	-11041,28	6241,28
	17,0	-960,000	2357,626	1,000	-9601,28	7681,28
	19,0	-3000,000	2357,626	,999	-11641,28	5641,28

19,0	20,0	-4320,000	2357,626	,948	-12961,28	4321,28
	1,0	3060,000	2357,626	,999	-5581,28	11701,28
	2,0	3000,000	2357,626	,999	-5641,28	11641,28
	3,0	1380,000	2357,626	1,000	-7261,28	10021,28
	4,0	-720,000	2357,626	1,000	-9361,28	7921,28
	5,0	2160,000	2357,626	1,000	-6481,28	10801,28
	6,0	60,000	2357,626	1,000	-8581,28	8701,28
	7,0	2040,000	2357,626	1,000	-6601,28	10681,28
	8,0	-15060,000*	2357,626	,000	-23701,28	-6418,72
	9,0	1320,000	2357,626	1,000	-7321,28	9961,28
	10,0	-3600,000	2357,626	,992	-12241,28	5041,28
	11,0	-3960,000	2357,626	,977	-12601,28	4681,28
	12,0	-4080,000	2357,626	,969	-12721,28	4561,28
	13,0	1200,000	2357,626	1,000	-7441,28	9841,28
	14,0	960,000	2357,626	1,000	-7681,28	9601,28
	15,0	1740,000	2357,626	1,000	-6901,28	10381,28
	16,0	600,000	2357,626	1,000	-8041,28	9241,28
	17,0	2040,000	2357,626	1,000	-6601,28	10681,28
	18,0	3000,000	2357,626	,999	-5641,28	11641,28
20,0	20,0	-1320,000	2357,626	1,000	-9961,28	7321,28
	1,0	4380,000	2357,626	,941	-4261,28	13021,28
	2,0	4320,000	2357,626	,948	-4321,28	12961,28
	3,0	2700,000	2357,626	1,000	-5941,28	11341,28
	4,0	600,000	2357,626	1,000	-8041,28	9241,28

5,0	3480,000	2357,626	,994	-5161,28	12121,28
6,0	1380,000	2357,626	1,000	-7261,28	10021,28
7,0	3360,000	2357,626	,996	-5281,28	12001,28
8,0	-13740,000*	2357,626	,000	-22381,28	-5098,72
9,0	2640,000	2357,626	1,000	-6001,28	11281,28
10,0	-2280,000	2357,626	1,000	-10921,28	6361,28
11,0	-2640,000	2357,626	1,000	-11281,28	6001,28
12,0	-2760,000	2357,626	1,000	-11401,28	5881,28
13,0	2520,000	2357,626	1,000	-6121,28	11161,28
14,0	2280,000	2357,626	1,000	-6361,28	10921,28
15,0	3060,000	2357,626	,999	-5581,28	11701,28
16,0	1920,000	2357,626	1,000	-6721,28	10561,28
17,0	3360,000	2357,626	,996	-5281,28	12001,28
18,0	4320,000	2357,626	,948	-4321,28	12961,28
19,0	1320,000	2357,626	1,000	-7321,28	9961,28

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Figura C-6. Subconjuntos homogéneos.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1,0	5	,00	
2,0	5	60,00	
18,0	5	60,00	

5,0	5	900,00	
7,0	5	1020,00	
17,0	5	1020,00	
15,0	5	1320,00	
3,0	5	1680,00	
9,0	5	1740,00	
13,0	5	1860,00	
14,0	5	2100,00	
16,0	5	2460,00	
6,0	5	3000,00	
19,0	5	3060,00	
4,0	5	3780,00	
20,0	5	4380,00	
10,0	5	6660,00	
11,0	5	7020,00	
12,0	5	7140,00	
8,0	5		18120,00
Sig.		,243	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

D. Anexo: memoria de cálculo de las pruebas sobre tecia solanivora

Anexo D. Memoria de cálculo para las pruebas sobre *Tecia solanivora*

De acuerdo a lo previamente descrito en la metodología, se partió de las concentraciones máximas alcanzadas dentro del rango definido, por lo que se obtuvieron los siguientes resultados.

- *Metarhizium sp.* aislado + Tween 80

$$[] = \frac{3237 \times 10.000}{5} = 6,5 \times 10^6 \text{ conidias/ml}$$

- *Metarhizium sp.* comercial + Tween 80

$$[] = \frac{3291 \times 10.000}{5} = 6,6 \times 10^6 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* aislada + Tween 80

$$[] = \frac{3455 \times 10.000}{5} = 6,7 \times 10^6 \text{ conidias/ml}$$

- *Beauveria sp.* comercial + Tween 80

$$[] = \frac{3344 \times 10.000}{5} = 6,9 \times 10^6 \text{ conidias/ml}$$

E. Anexo: registro pruebas sobre tecia solanivora

Figura E-1. Registro mortalidad pruebas sobre *Tecia solanivora*

Tratamiento	24	48	72	96	120	144	168	192
1.1	-	1	1	1	4	5	6	6
1.2	-	3	3	3	3	4	4	4
1.3	2	3	3	3	3	3	3	3
2.1	2	3	3	3	3	3	3	4
2.2	-	-	1	1	1	2	2	4
2.3	4	4	4	4	4	5	5	5
3.1	1	1	3	3	3	3	3	3
3.2	1	2	2	2	2	3	4	5
3.3	1	3	3	3	3	3	3	3
4.1	-	-	-	-	1	1	2	4
4.2	-	-	-	-	-	-	1	2
4.3	1	2	2	3	3	3	4	5
5.1	-	-	2	2	4	4	4	4
5.2	-	-	-	2	2	3	5	5
5.3	-	-	2	2	2	3	3	3
6.1	-	-	-	1	2	2	2	2
6.2	-	1	1	2	4	4	4	5
6.3	-	-	2	3	4	4	4	4
7.1	-	1	3	3	3	3	4	4
7.2	1	2	2	3	4	4	4	4
7.3	-	-	2	2	2	3	3	4
8.1	-	-	-	-	1	1	1	2
8.2	-	1	1	2	2	2	4	5
8.3	-	1	1	1	1	1	1	2
9.1	-	1	2	2	2	2	2	3
9.2	-	-	-	-	1	1	4	4
9.3	-	1	1	2	3	3	3	4
1-1	-	-	-	1	2	2	4	5
1-2	-	-	-	1	2	2	4	5
1-3	-	2	2	3	5	5	5	5
11.1	-	1	1	1	2	2	4	5
11.2	-	-	-	1	1	1	3	3
11.3	-	-	-	1	3	3	4	4
12.1	-	1	1	4	4	4	4	5
12.2	-	-	-	-	-	-	1	1
12.3	-	1	2	4	4	4	4	4
13.1	1	1	1	1	1	1	2	2
13.2	1	2	2	2	2	2	5	5
13.3	-	-	-	1	1	1	3	3
14.1	-	-	1	1	1	2	4	4
14.2	-	1	1	1	1	1	2	2
14.3	-	-	-	-	-	-	2	2
15.1	-	3	3	4	4	4	5	5
15.2	-	1	1	2	3	3	3	4
15.3	-	3	3	3	5	5	5	5
16.1	-	-	1	1	1	1	2	3
16.2	-	2	3	3	4	4	4	5
16.3	-	3	3	4	5	5	5	5
17.1	-	-	-	-	-	-	2	2
17.2	-	-	-	-	-	1	1	1
17.3	-	-	-	-	-	-	-	-

F. Anexo: resultados estadísticos para la determinación de la cl_{50}

Figura F-1. Áreas bajo la curva de las pruebas sobre *Tecia solanivora*

Tratamiento	Area	Tratamiento	Area
1.1	792	10.1	552
1.2	732	10.2	552
1.3	744	10.3	840
2.1	744	11.1	600
2.2	408	11.2	396
2.3	972	11.3	540
3.1	576	12.1	732
3.2	672	12.2	132
3.3	624	12.3	708
4.1	372	13.1	300
4.2	180	13.2	672
4.3	756	13.3	372
5.1	660	14.1	492
5.2	624	14.2	360
5.3	504	14.3	168
6.1	288	15.1	852
6.2	684	15.2	624
6.3	684	15.3	876
7.1	684	16.1	396
7.2	744	16.2	780
7.3	528	16.3	912
8.1	240	17.1	168
8.2	624	17.2	108
8.3	312	17.3	108
9.1	528		
9.2	456		
9.3	624		

Figura F-2. ANOVA de un factor (*Tecia solanivora*)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo
					Límite inferior	Límite superior	
1,0	3	508,00	18,330	10,583	462,47	553,53	492
2,0	3	484,00	258,581	149,292	-158,35	1126,35	216
3,0	3	448,00	27,713	16,000	379,16	516,84	432
4,0	3	224,00	226,839	130,966	-339,50	787,50	48
5,0	3	368,00	56,710	32,741	227,13	508,87	324
6,0	3	364,00	149,077	86,070	-6,33	734,33	192
7,0	3	436,00	91,652	52,915	208,33	663,67	336
8,0	3	204,00	129,800	74,940	-118,44	526,44	96
9,0	3	284,00	85,135	49,153	72,51	495,49	192
10,0	3	380,00	180,133	104,000	-67,48	827,48	276
11,0	3	272,00	79,900	46,130	73,52	470,48	180
12,0	3	344,00	266,803	154,039	-318,78	1006,78	36
13,0	3	272,00	139,083	80,299	-73,50	617,50	180
14,0	3	176,00	96,995	56,000	-64,95	416,95	72
15,0	3	536,00	152,892	88,272	156,19	915,81	360
16,0	3	460,00	249,800	144,222	-160,54	1080,54	180
17,0	3	44,00	38,575	22,271	-51,82	139,82	0
Total	51	341,41	182,215	25,515	290,16	392,66	0

Figura F-3. Estadísticos descriptivos (*Tecia solanivora*)

	Máximo
1,0	528
2,0	732
3,0	480
4,0	480
5,0	432
6,0	456
7,0	516
8,0	348
9,0	360
10,0	588
11,0	324
12,0	504
13,0	432
14,0	264
15,0	636
16,0	660
17,0	72
Total	732

Figura F-4. Prueba de homogeneidad de varianzas (*Tecia solanivora*)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,840	16	34	,005

Figura F-5. Significancia de los datos (*Tecia solanivora*)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	853338,353	16	53333,647	2,248	,023
Intra-grupos	806784,000	34	23728,941		
Total	1660122,353	50			

Figura F-6. Comparaciones múltiples (*Tecia solanivora*)

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,0	2,0	24,000	125,775	1,000	-445,12	493,12
	3,0	60,000	125,775	1,000	-409,12	529,12
	4,0	284,000	125,775	,680	-185,12	753,12
	5,0	140,000	125,775	,999	-329,12	609,12
	6,0	144,000	125,775	,999	-325,12	613,12
	7,0	72,000	125,775	1,000	-397,12	541,12
	8,0	304,000	125,775	,575	-165,12	773,12
	9,0	224,000	125,775	,921	-245,12	693,12

2,0	10,0	128,000	125,775	1,000	-341,12	597,12
	11,0	236,000	125,775	,886	-233,12	705,12
	12,0	164,000	125,775	,995	-305,12	633,12
	13,0	236,000	125,775	,886	-233,12	705,12
	14,0	332,000	125,775	,431	-137,12	801,12
	15,0	-28,000	125,775	1,000	-497,12	441,12
	16,0	48,000	125,775	1,000	-421,12	517,12
	17,0	464,000	125,775	,055	-5,12	933,12
	1,0	-24,000	125,775	1,000	-493,12	445,12
	3,0	36,000	125,775	1,000	-433,12	505,12
	4,0	260,000	125,775	,795	-209,12	729,12
	5,0	116,000	125,775	1,000	-353,12	585,12
	6,0	120,000	125,775	1,000	-349,12	589,12
	7,0	48,000	125,775	1,000	-421,12	517,12
	8,0	280,000	125,775	,701	-189,12	749,12
	9,0	200,000	125,775	,967	-269,12	669,12
	10,0	104,000	125,775	1,000	-365,12	573,12
	11,0	212,000	125,775	,948	-257,12	681,12
	12,0	140,000	125,775	,999	-329,12	609,12
	13,0	212,000	125,775	,948	-257,12	681,12
	14,0	308,000	125,775	,554	-161,12	777,12
	15,0	-52,000	125,775	1,000	-521,12	417,12
	16,0	24,000	125,775	1,000	-445,12	493,12
	17,0	440,000	125,775	,086	-29,12	909,12

3,0	1,0	-60,000	125,775	1,000	-529,12	409,12
	2,0	-36,000	125,775	1,000	-505,12	433,12
	4,0	224,000	125,775	,921	-245,12	693,12
	5,0	80,000	125,775	1,000	-389,12	549,12
	6,0	84,000	125,775	1,000	-385,12	553,12
	7,0	12,000	125,775	1,000	-457,12	481,12
	8,0	244,000	125,775	,859	-225,12	713,12
	9,0	164,000	125,775	,995	-305,12	633,12
	10,0	68,000	125,775	1,000	-401,12	537,12
	11,0	176,000	125,775	,990	-293,12	645,12
	12,0	104,000	125,775	1,000	-365,12	573,12
	13,0	176,000	125,775	,990	-293,12	645,12
	14,0	272,000	125,775	,740	-197,12	741,12
	15,0	-88,000	125,775	1,000	-557,12	381,12
	16,0	-12,000	125,775	1,000	-481,12	457,12
	17,0	404,000	125,775	,158	-65,12	873,12
4,0	1,0	-284,000	125,775	,680	-753,12	185,12
	2,0	-260,000	125,775	,795	-729,12	209,12
	3,0	-224,000	125,775	,921	-693,12	245,12
	5,0	-144,000	125,775	,999	-613,12	325,12
	6,0	-140,000	125,775	,999	-609,12	329,12
	7,0	-212,000	125,775	,948	-681,12	257,12
	8,0	20,000	125,775	1,000	-449,12	489,12
	9,0	-60,000	125,775	1,000	-529,12	409,12
	10,0	-156,000	125,775	,997	-625,12	313,12

5,0	11,0	-48,000	125,775	1,000	-517,12	421,12
	12,0	-120,000	125,775	1,000	-589,12	349,12
	13,0	-48,000	125,775	1,000	-517,12	421,12
	14,0	48,000	125,775	1,000	-421,12	517,12
	15,0	-312,000	125,775	,533	-781,12	157,12
	16,0	-236,000	125,775	,886	-705,12	233,12
	17,0	180,000	125,775	,987	-289,12	649,12
	1,0	-140,000	125,775	,999	-609,12	329,12
	2,0	-116,000	125,775	1,000	-585,12	353,12
	3,0	-80,000	125,775	1,000	-549,12	389,12
	4,0	144,000	125,775	,999	-325,12	613,12
	6,0	4,000	125,775	1,000	-465,12	473,12
	7,0	-68,000	125,775	1,000	-537,12	401,12
	8,0	164,000	125,775	,995	-305,12	633,12
	9,0	84,000	125,775	1,000	-385,12	553,12
	10,0	-12,000	125,775	1,000	-481,12	457,12
	11,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	12,0	24,000	125,775	1,000	-445,12	493,12
	13,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	14,0	192,000	125,775	,977	-277,12	661,12
	15,0	-168,000	125,775	,994	-637,12	301,12
6,0	16,0	-92,000	125,775	1,000	-561,12	377,12
	17,0	324,000	125,775	,471	-145,12	793,12
	1,0	-144,000	125,775	,999	-613,12	325,12
	2,0	-120,000	125,775	1,000	-589,12	349,12

	3,0	-84,000	125,775	1,000	-553,12	385,12
	4,0	140,000	125,775	,999	-329,12	609,12
	5,0	-4,000	125,775	1,000	-473,12	465,12
	7,0	-72,000	125,775	1,000	-541,12	397,12
	8,0	160,000	125,775	,996	-309,12	629,12
	9,0	80,000	125,775	1,000	-389,12	549,12
	10,0	-16,000	125,775	1,000	-485,12	453,12
	11,0	92,000	125,775	1,000	-377,12	561,12
	12,0	20,000	125,775	1,000	-449,12	489,12
	13,0	92,000	125,775	1,000	-377,12	561,12
	14,0	188,000	125,775	,981	-281,12	657,12
	15,0	-172,000	125,775	,992	-641,12	297,12
	16,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	17,0	320,000	125,775	,491	-149,12	789,12
	1,0	-72,000	125,775	1,000	-541,12	397,12
	2,0	-48,000	125,775	1,000	-517,12	421,12
	3,0	-12,000	125,775	1,000	-481,12	457,12
	4,0	212,000	125,775	,948	-257,12	681,12
	5,0	68,000	125,775	1,000	-401,12	537,12
7,0	6,0	72,000	125,775	1,000	-397,12	541,12
	8,0	232,000	125,775	,899	-237,12	701,12
	9,0	152,000	125,775	,998	-317,12	621,12
	10,0	56,000	125,775	1,000	-413,12	525,12
	11,0	164,000	125,775	,995	-305,12	633,12
	12,0	92,000	125,775	1,000	-377,12	561,12

8,0	13,0	164,000	125,775	,995	-305,12	633,12
	14,0	260,000	125,775	,795	-209,12	729,12
	15,0	-100,000	125,775	1,000	-569,12	369,12
	16,0	-24,000	125,775	1,000	-493,12	445,12
	17,0	392,000	125,775	,191	-77,12	861,12
	1,0	-304,000	125,775	,575	-773,12	165,12
	2,0	-280,000	125,775	,701	-749,12	189,12
	3,0	-244,000	125,775	,859	-713,12	225,12
	4,0	-20,000	125,775	1,000	-489,12	449,12
	5,0	-164,000	125,775	,995	-633,12	305,12
	6,0	-160,000	125,775	,996	-629,12	309,12
	7,0	-232,000	125,775	,899	-701,12	237,12
	9,0	-80,000	125,775	1,000	-549,12	389,12
	10,0	-176,000	125,775	,990	-645,12	293,12
	11,0	-68,000	125,775	1,000	-537,12	401,12
	12,0	-140,000	125,775	,999	-609,12	329,12
	13,0	-68,000	125,775	1,000	-537,12	401,12
	14,0	28,000	125,775	1,000	-441,12	497,12
	15,0	-332,000	125,775	,431	-801,12	137,12
	16,0	-256,000	125,775	,812	-725,12	213,12
9,0	17,0	160,000	125,775	,996	-309,12	629,12
	1,0	-224,000	125,775	,921	-693,12	245,12
	2,0	-200,000	125,775	,967	-669,12	269,12
	3,0	-164,000	125,775	,995	-633,12	305,12
	4,0	60,000	125,775	1,000	-409,12	529,12

	5,0	-84,000	125,775	1,000	-553,12	385,12
	6,0	-80,000	125,775	1,000	-549,12	389,12
	7,0	-152,000	125,775	,998	-621,12	317,12
	8,0	80,000	125,775	1,000	-389,12	549,12
	10,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	11,0	12,000	125,775	1,000	-457,12	481,12
	12,0	-60,000	125,775	1,000	-529,12	409,12
	13,0	12,000	125,775	1,000	-457,12	481,12
	14,0	108,000	125,775	1,000	-361,12	577,12
	15,0	-252,000	125,775	,829	-721,12	217,12
	16,0	-176,000	125,775	,990	-645,12	293,12
	17,0	240,000	125,775	,873	-229,12	709,12
	1,0	-128,000	125,775	1,000	-597,12	341,12
	2,0	-104,000	125,775	1,000	-573,12	365,12
	3,0	-68,000	125,775	1,000	-537,12	401,12
	4,0	156,000	125,775	,997	-313,12	625,12
	5,0	12,000	125,775	1,000	-457,12	481,12
	6,0	16,000	125,775	1,000	-453,12	485,12
10,0	7,0	-56,000	125,775	1,000	-525,12	413,12
	8,0	176,000	125,775	,990	-293,12	645,12
	9,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	11,0	108,000	125,775	1,000	-361,12	577,12
	12,0	36,000	125,775	1,000	-433,12	505,12
	13,0	108,000	125,775	1,000	-361,12	577,12
	14,0	204,000	125,775	,962	-265,12	673,12

11,0	15,0	-156,000	125,775	,997	-625,12	313,12
	16,0	-80,000	125,775	1,000	-549,12	389,12
	17,0	336,000	125,775	,411	-133,12	805,12
	1,0	-236,000	125,775	,886	-705,12	233,12
	2,0	-212,000	125,775	,948	-681,12	257,12
	3,0	-176,000	125,775	,990	-645,12	293,12
	4,0	48,000	125,775	1,000	-421,12	517,12
	5,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	6,0	-92,000	125,775	1,000	-561,12	377,12
	7,0	-164,000	125,775	,995	-633,12	305,12
	8,0	68,000	125,775	1,000	-401,12	537,12
	9,0	-12,000	125,775	1,000	-481,12	457,12
	10,0	-108,000	125,775	1,000	-577,12	361,12
	12,0	-72,000	125,775	1,000	-541,12	397,12
	13,0	,000	125,775	1,000	-469,12	469,12
	14,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	15,0	-264,000	125,775	,777	-733,12	205,12
	16,0	-188,000	125,775	,981	-657,12	281,12
	17,0	228,000	125,775	,910	-241,12	697,12
	1,0	-164,000	125,775	,995	-633,12	305,12
12,0	2,0	-140,000	125,775	,999	-609,12	329,12
	3,0	-104,000	125,775	1,000	-573,12	365,12
	4,0	120,000	125,775	1,000	-349,12	589,12
	5,0	-24,000	125,775	1,000	-493,12	445,12
	6,0	-20,000	125,775	1,000	-489,12	449,12

	7,0	-92,000	125,775	1,000	-561,12	377,12
	8,0	140,000	125,775	,999	-329,12	609,12
	9,0	60,000	125,775	1,000	-409,12	529,12
	10,0	-36,000	125,775	1,000	-505,12	433,12
	11,0	72,000	125,775	1,000	-397,12	541,12
	13,0	72,000	125,775	1,000	-397,12	541,12
	14,0	168,000	125,775	,994	-301,12	637,12
	15,0	-192,000	125,775	,977	-661,12	277,12
	16,0	-116,000	125,775	1,000	-585,12	353,12
	17,0	300,000	125,775	,597	-169,12	769,12
	1,0	-236,000	125,775	,886	-705,12	233,12
	2,0	-212,000	125,775	,948	-681,12	257,12
	3,0	-176,000	125,775	,990	-645,12	293,12
	4,0	48,000	125,775	1,000	-421,12	517,12
	5,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	6,0	-92,000	125,775	1,000	-561,12	377,12
	7,0	-164,000	125,775	,995	-633,12	305,12
13,0	8,0	68,000	125,775	1,000	-401,12	537,12
	9,0	-12,000	125,775	1,000	-481,12	457,12
	10,0	-108,000	125,775	1,000	-577,12	361,12
	11,0	,000	125,775	1,000	-469,12	469,12
	12,0	-72,000	125,775	1,000	-541,12	397,12
	14,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	15,0	-264,000	125,775	,777	-733,12	205,12
	16,0	-188,000	125,775	,981	-657,12	281,12

14,0	17,0	228,000	125,775	,910	-241,12	697,12
	1,0	-332,000	125,775	,431	-801,12	137,12
	2,0	-308,000	125,775	,554	-777,12	161,12
	3,0	-272,000	125,775	,740	-741,12	197,12
	4,0	-48,000	125,775	1,000	-517,12	421,12
	5,0	-192,000	125,775	,977	-661,12	277,12
	6,0	-188,000	125,775	,981	-657,12	281,12
	7,0	-260,000	125,775	,795	-729,12	209,12
	8,0	-28,000	125,775	1,000	-497,12	441,12
	9,0	-108,000	125,775	1,000	-577,12	361,12
	10,0	-204,000	125,775	,962	-673,12	265,12
	11,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	12,0	-168,000	125,775	,994	-637,12	301,12
	13,0	-96,000	125,775	1,000	-565,12	373,12
	15,0	-360,000	125,775	,304	-829,12	109,12
	16,0	-284,000	125,775	,680	-753,12	185,12
	17,0	132,000	125,775	1,000	-337,12	601,12
15,0	1,0	28,000	125,775	1,000	-441,12	497,12
	2,0	52,000	125,775	1,000	-417,12	521,12
	3,0	88,000	125,775	1,000	-381,12	557,12
	4,0	312,000	125,775	,533	-157,12	781,12
	5,0	168,000	125,775	,994	-301,12	637,12
	6,0	172,000	125,775	,992	-297,12	641,12
	7,0	100,000	125,775	1,000	-369,12	569,12
	8,0	332,000	125,775	,431	-137,12	801,12

16,0	9,0	252,000	125,775	,829	-217,12	721,12
	10,0	156,000	125,775	,997	-313,12	625,12
	11,0	264,000	125,775	,777	-205,12	733,12
	12,0	192,000	125,775	,977	-277,12	661,12
	13,0	264,000	125,775	,777	-205,12	733,12
	14,0	360,000	125,775	,304	-109,12	829,12
	16,0	76,000	125,775	1,000	-393,12	545,12
	17,0	492,000*	125,775	,032	22,88	961,12
	1,0	-48,000	125,775	1,000	-517,12	421,12
	2,0	-24,000	125,775	1,000	-493,12	445,12
	3,0	12,000	125,775	1,000	-457,12	481,12
	4,0	236,000	125,775	,886	-233,12	705,12
	5,0	92,000	125,775	1,000	-377,12	561,12
	6,0	96,000	125,775	1,000	-373,12	565,12
	7,0	24,000	125,775	1,000	-445,12	493,12
	8,0	256,000	125,775	,812	-213,12	725,12
	9,0	176,000	125,775	,990	-293,12	645,12
	10,0	80,000	125,775	1,000	-389,12	549,12
	11,0	188,000	125,775	,981	-281,12	657,12
	12,0	116,000	125,775	1,000	-353,12	585,12
	13,0	188,000	125,775	,981	-281,12	657,12
	14,0	284,000	125,775	,680	-185,12	753,12
	15,0	-76,000	125,775	1,000	-545,12	393,12
	17,0	416,000	125,775	,130	-53,12	885,12

17,0	1,0	-464,000	125,775	,055	-933,12	5,12
	2,0	-440,000	125,775	,086	-909,12	29,12
	3,0	-404,000	125,775	,158	-873,12	65,12
	4,0	-180,000	125,775	,987	-649,12	289,12
	5,0	-324,000	125,775	,471	-793,12	145,12
	6,0	-320,000	125,775	,491	-789,12	149,12
	7,0	-392,000	125,775	,191	-861,12	77,12
	8,0	-160,000	125,775	,996	-629,12	309,12
	9,0	-240,000	125,775	,873	-709,12	229,12
	10,0	-336,000	125,775	,411	-805,12	133,12
	11,0	-228,000	125,775	,910	-697,12	241,12
	12,0	-300,000	125,775	,597	-769,12	169,12
	13,0	-228,000	125,775	,910	-697,12	241,12
	14,0	-132,000	125,775	1,000	-601,12	337,12
	15,0	-492,000*	125,775	,032	-961,12	-22,88
	16,0	-416,000	125,775	,130	-885,12	53,12

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Figura F-7. Subconjuntos homogéneos (*Tecia solanivora*)

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
17,0	3	44,00	
14,0	3	176,00	176,00
8,0	3	204,00	204,00

4,0	3	224,00	224,00
11,0	3	272,00	272,00
13,0	3	272,00	272,00
9,0	3	284,00	284,00
12,0	3	344,00	344,00
6,0	3	364,00	364,00
5,0	3	368,00	368,00
10,0	3	380,00	380,00
7,0	3	436,00	436,00
3,0	3	448,00	448,00
16,0	3	460,00	460,00
2,0	3	484,00	484,00
1,0	3	508,00	508,00
15,0	3		536,00
Sig.		,055	,304

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

G. Anexo: memoria de cálculo de la cl_{50} por medio del uso del software PROSTAT.

ANEXO G. Memoria de cálculo de la CL₅₀.

=====

Drug and Response Analysis: LD50/LC50

Data File Name: Beauveria Aislada

=====

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality21=A+B*Log10_conc19

Input Data ...

Dose/Concentration ->	conc
Dead Number ->	muertos
Total Number ->	total
Control Group ->	testigo

Results ...

Parameter A:	-0.4834653
Parameter B(slope):	0.138916874
Deviance:	13.36263277
AIC:	39.13126638

LD50/LC50 Value:	3021.68323449
LOG10(LD50/LC50) Value:	3.48024893

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	0.111993165
Upper Limit:	81527918.006

=====

----Created with ProStat
----Tue Dec 05 17:46:28 2017

=====

=====

Drug and Response Analysis: LD50/LC50

Data File Name: Beauveria Comercial

=====

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality14=A+B*Log10_Conc12

Input Data ...

Dose/Concentration ->	Conc
Dead Number ->	Muertos
Total Number ->	Total
Control Group ->	Testigo

Results ...

Parameter A:	-0.63428673
Parameter B(slope):	0.134936966
Deviance:	17.98611518
AIC:	42.38233438

LD50/LC50 Value:	50189.746724
LOG10(LD50/LC50) Value:	4.700615

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	100.44115341
Upper Limit:	25079467.8349

=====

----Created with ProStat
----Tue Dec 05 17:44:33 2017

=====

=====

Drug and Response Analysis: LD50/LC50

Data File Name: Metarhizium Comercial

=====

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality28=A+B*Log10_conc26

Input Data ...

Dose/Concentration ->	conc
Dead Number ->	muertos
Total Number ->	total
Control Group ->	testigo

Results ...

Parameter A:	-0.290450264
Parameter B(slope):	0.102346481
Deviance:	15.48737851
AIC:	40.91621405
LD50/LC50 Value:	688.51210427
LOG10(LD50/LC50) Value:	2.83791158

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	0.00001661812
Upper Limit:	28526031312.9

=====

----Created with ProStat
----Tue Dec 05 17:48:41 2017

=====

=====

Drug and Response Analysis: LD50/LC50

Data File Name: Metarhizium Aislado

=====

Fitting Model -> Probit Model
Model Equation: Probit_Mortality35=A+B*Log10_conc33

Input Data ...

Dose/Concentration ->	conc
Dead Number ->	muertos
Total Number ->	total
Control Group ->	testigo

Results ...

Parameter A:	1.50246935
Parameter B(slope):	-0.257436013

Deviance:	16.45518783
AIC:	41.54422529

LD50/LC50 Value:	685934.58131
LOG10(LD50/LC50) Value:	5.8362827

95% Confidence Interval for LD50/LC50...

Lower Limit:	29464.5492307
Upper Limit:	15968554.1478

=====

----Created with ProStat
----Tue Dec 05 17:51:00 2017

=====