



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS

NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PROPAGACIÓN DE *Metarhizium spp.* EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024”.

Proyecto de investigación presentado previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma

Autor:

Freire Guaman Alison Valeria

Tutora:

Toapanta Gallegos Diana Elizabeth

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Freire Guaman Alison Valeria, con cédula de ciudadanía No. 1729308518 ; declaro ser autor del presente proyecto de investigación: **“PROPAGACIÓN DE *METARHIZIUM SPP.* EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024”**, siendo la Ingeniera Mg. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



Alison Valeria Freire Guaman
CC: 1729308518
ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **FREIRE GUAMAN ALISON VALERIA**, identificada con cédula de ciudadanía **172930851-8** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, Dra. Idalia Pacheco Tigselema, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la Carrera de Ingeniería Agronómica, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de **"PROPAGACIÓN DE METARHIZIUM SPP. EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024"**, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico:

Inicio de la carrera: Marzo 2019-Agosto 2019

Finalización de la carrera: Octubre 2023-Febrero 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 28 de noviembre del 2023

Tutora: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Tema: **"PROPAGACIÓN DE METARHIZIUM SPP. EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024"**.

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito

obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se

producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 23 días del mes de noviembre del 2023.



Alison Valeria Freire Guaman
LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema.
LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación sobre el título:

“PROPAGACIÓN DE *METARHIZIUM SPP.* EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024”, de Freire Guaman Alison Valeria, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 20 de febrero del 2024



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg

C.C: 1002749800


DOCENTE TUTORA

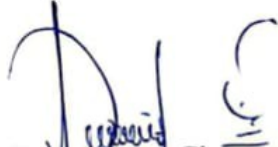
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante :Freire Guaman Alison Valeria , con el titulo de Proyecto de Investigación: **“PROPAGACIÓN DE METARHIZIUM SPP EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM OFFICINARUM), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 20 de febrero del 2024


Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espin,
Ph.D.
C.C: 0501148837
LECTOR 1 (PRESIDENTE)


Ing. Francisco Hernán Chancusig, Mg.
C.C: 0501883920
LECTOR 2 (MIEMBRO)


Ing. Paolo Chasi Vizquete, Mg.
C.C: 0502409725
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme bendecido con una familia maravillosa, mi Madre quien han estado siempre presente apoyándome incondicionalmente, a mis tíos y padrinos, infinitamente agradezco a mis hermanos Santiago Olmedo, Jordán Vicente y Benjamín Vicente, por sus palabras de aliento y consejos de no rendirme para poder culminar una de mis metas plasmadas en mi vida.

De igual manera la Universidad Técnica de Cotopaxi en especial a la Carrera de Agronomía por permitir ser una profesional, a mis docentes que cada uno de ellos hizo parte de este proceso de formación.

A mis amistades, por ser unas excelentes personas y amigos/as; por formar parte de esta maravillosa etapa de mi vida, agradecerles por los buenos y malos momentos que pasamos juntos; por las experiencias y conocimientos que impartimos juntos durante estos años.

También quiero expresar mi fraterno agradecimiento a la Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos (tutora de mi proyecto de investigación), Ing. Tannya Elizabeth Llanos Proaño, Mg., Ing. Marco Antonio Rivera Moreno por su paciencia y colaboración. Agradezco a la fundación Maquita Cushunchi al Ing. Angel Crillo y al Ing. Fredy Pita por haber financiado mi proyecto de investigación.

Alison Valeria Freire Guamán

DEDICATORIA

Mi proyecto de investigación se lo dedico a mi madre María Amalia Guaman y a mi abuelita difunta María Melchora Guaman por sus sacrificios y esfuerzos por darme una carrera y por creer en mi capacidad, lograron forjar a una mujer con un gran carácter y con un corazón bondadoso.

A mis hermanos Santiago Olmedo, Jordán Vicente y Benjamín Vicente, por sus palabras de aliento.

A mi pareja Marlon Paspuel por su apoyo que con su cariño y dedicación ha sido un pilar fundamental en mi vida y una gran inspiración.

A mi familia por ser fuente de motivación e inspiración para poder superarme día a día, a mis padrinos Maribel Freire, Jaime Freire y Fernando Gutiérrez por sus palabras de aliento, con todo el cariño a mi Tío José Fausto de la Torre, Primo Paul de la Torre, Primo Joel de la Torre y Tía Ruth Salazar por su apoyo incondicional desde mi niñez.

Alison Valeria Freire Guamán

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.

TÍTULO “PROPAGACIÓN DE *METARHIZIUM SPP.* EN SUSTRATO VEGETAL (ARROZ PRECOCIDO) OBTENIDO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*), DEL CANTÓN SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO DE LA PROVINCIA COTOPAXI, EN LOS LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI 2023-2024”.

Autor:

Freire Guaman Alison Valeria

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la propagación del hongo (*Metarhizium spp.*) en sustrato vegetal (arroz precocido), obtenido del cantón Sigchos parroquia Palo Quemado de la Provincia Cotopaxi, del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Se realizaron treinta re - aislamientos del hongo almacenado en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi; posteriormente se realizó la inoculación en cincuenta fundas con cierre hermético, con 120gr de sustrato vegetal (arroz precocido), con la técnica de corte de cuadrados de 1 cm x 1 cm de la superficie del hongo, las fundas inoculadas se incubaron durante tres días sin luz a 25°C, transcurrido este tiempo se trasladaron al cuarto crecimiento durante tres días de luz para el desarrollo del hongo (*Metarhizium spp.*). El secado del sustrato se realizó en bandejas de aluminio, en incubación durante tres días a una temperatura de 28° C, permitiendo la evaporación de la humedad del sustrato. Para el conteo de conidias por gramo de sustrato, se elaboró una solución madre y cinco soluciones seriadas, a partir de la cual la solución 10^{-3} refleja un valor de 4×10^8 conidias por gramo de sustrato vegetal. El empaquetamiento, cierre y etiquetado se realizó en fundas con cierre hermético de 10 cm x 18 cm, con un peso de 20 gr de sustrato. Finalmente, luego de un periodo de seis meses de almacenamiento del sustrato, se realizó un nuevo conteo de conidias en la solución 10^{-3} , el cual nos proporcionó un valor de 2×10^8 conidias por gramo de sustrato, confirmando la prevalencia de conidias en el sustrato elaborado.

Palabras clave: *Metarhizium spp*, *Saccharum officinarum* L, sustrato vegetal, caña de azúcar, Conid

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

THEME: "PROPAGATION OF METARHIZIUM SPP. IN VEGETABLE SUBSTRATE (PRECOOKED RICE) OBTAINED FROM SUGAR CANE (SACCHARUM OFFICINARUM) CULTIVATION, IN THE CANTON SIGCHOS PARROQUIA PALO QUEMADO OF THE PROVINCE OF COTOPAXI, IN THE LABORATORIES OF THE TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI 2023-2024"."

Author:

Freire Guaman Alison Valeria

ABSTRACT

The objective of this research work was the propagation of the fungus (*Metarhizium* spp) in vegetable substrate (parboiled rice), obtained from the Sigchos canton, Palo Quemado parish, Cotopaxi Province, from the cultivation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). Thirty re-isolations of the fungus stored in the laboratory of the Technical University of Cotopaxi were made; subsequently, inoculation was carried out in fifty hermetically sealed bags, with 120 g of vegetable substrate (parboiled rice), using the technique of cutting squares of 1 cm x 1 cm of the surface of the fungus, the inoculated bags were incubated for three days without light at 25°C, after which time they were transferred to the fourth growth room for three days of light for the development of the fungus (*Metarhizium* spp). The substrate was dried in aluminium trays, incubated for three days at a temperature of 28°C, allowing the moisture in the substrate to evaporate. For the count of conidia per gram of substrate, a stock solution and five serial solutions were prepared, from which the 10⁽⁻³⁾ solution reflects a value of 4×10⁸ conidia per gram of plant substrate. Packaging, sealing and labelling was carried out in hermetically sealed bags of 10 cm x 18 cm, weighing 20 g of substrate. Finally, after a period of six months of storage of the substrate, a new count of conidia in the 10⁽⁻³⁾ solution was carried out, which gave a value of 2×10⁸ conidia per gram of substrate, confirming the prevalence of conidia in the substrate prepared.

KEYWORDS: *Metarhizium* spp, *Saccharum officinarum* L, Plant substrate, Sugar cane, Conidias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
RESUMEN..	x
ABSTRACT.....	xi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xvi
INDICE DE TABLA.....	xviii
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	3
3.1. Beneficiarios directos:	3
3.2. Beneficiarios indirectos:	3
4. PROBLEMÁTICA.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. Objetivo General	4
5.2. Objetivos específicos.....	5
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	6
7.1. Microorganismos del suelo	6
7.2. Distribución de los microorganismos del suelo.....	7

7.3.	Factores que influyen en la diversidad de microorganismos en el suelo	8
8.	Microorganismos Benéficos	10
8.1.	Aplicación de los Microorganismos Benéficos:.....	10
8.2.	Funciones de los Microorganismos Benéficos.....	10
8.3.	Importancia de los microorganismos benéficos.....	10
9.	Ciclo de vida salivazo (<i>Mahanarva andigena</i>)	11
9.1.	Huevos.....	11
9.2.	Adultos.....	12
9.3.	Ingreso de plaga salivazo (<i>Mahanarva andigena</i>).....	12
9.4.	Hábitos y daños.....	13
9.5.	Distribución.....	13
9.6.	Temperatura y humedad.....	13
9.7.	Daños causados por el salivazo (<i>Mahanarva andigena</i>)	14
10.	Microorganismos Benéficos	14
10.1.	Aplicación de los Microorganismos Benéficos:.....	14
10.2.	Funciones de los Microorganismos Benéficos	15
10.3.	La importancia de los microorganismos benéficos	15
11.	Ecología de <i>Metarhizium spp.</i>	15
12.	La clasificación de la taxonómica de <i>Metarhizium spp</i>	17
12.1.	Donde se encuentra el hongo <i>Metarhizium spp</i>	18
12.2.	Plagas que ataca el hongo <i>Metarhizium spp</i>	18
12.3.	Características del hongo <i>Metarhizium spp</i>	18
12.4.	Mecanismos de acción del hongo <i>Metarhizium spp</i>	19
12.5.	En la penetración participan dos mecanismos:	20
12.6.	Modo de Acción de <i>Metarhizium spp</i>	20
12.7.	Especies sensibles al Hongo <i>Metarhizium spp</i>	20
13.	Recolección de muestras en el campo	21
14.	Aislamiento.....	22
15.	Protocolo de replicación.	24
15.1.	Reactivación.....	24
15.2.	Preparación de matrices.....	25

16.	Preparación del sustrato	25
16.1.	Inoculación del sustrato con una suspensión de esporas	25
16.2.	Inoculación del sustrato matriz sólida	27
16.3.	Inoculación directa de conidias a partir de la caja petri.....	28
17.	Secado del producto.....	28
18.	HIPÓTESIS.....	29
18.1.	Hipótesis nula	29
18.2.	Hipótesis alternativa.	29
19.	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
19.1.	Tipos de investigación.....	29
19.2.	Investigación bibliográfica.....	29
20.	Métodos de Investigación	29
20.1.	Cualitativo	29
21.	Técnicas de Investigación.....	29
22.	METODOLOGÍA.....	30
22.1.	Ubicación de la investigación.....	30
22.2.	Materiales, reactivos y equipos.....	30
22.3.	PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN.....	31
22.3.1.	Crecimiento del hongo <i>Metarhizium</i>	31
22.3.1.	Re-aislamientos del Hongo almacenado en el laboratorio de Microbiología.....	33
22.4.	Proceso de producción del sustrato	34
22.5.	SECADO DEL SUSTRATO.....	38
23.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	39
23.1.	PRUEBA DE VIABILIDAD DE CONIDIAS EN EL SUSTRATO.....	39
23.1.1.1.	Concentración de Conidias	39
23.1.2.	Valor de conidias de <i>Metarhizium</i> spp por gramo de sustrato	42
23.2.	Elaboración y socialización de la Guía de propagación de <i>Metarhizium</i> spp.....	43
24.	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES, ECONÓMICOS).	44
24.1.	Impactos Técnicos.....	44
24.2.	11.2 Impactos Sociales.	45
24.3.	Impactos Ambientales.....	45

24.4.	Impactos Económicos.....	45
25.	CONCLUSIONES.....	45
26.	RECOMENDACIONES.....	45
27.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Cultivo del hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	19
Figura 2:	Captura de insectos con conidias de <i>Metarhizium</i> spp.....	21
Figura 3:	Insecto cubierto de micelio de <i>Metarhizium</i> spp	22
Figura 4:	Aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp en la caja Petri	22
Figura 5:	Aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp en tubo de ensayo.....	23
Figura 6:	Placa petri con conidias de <i>Metarhizium</i> spp	24
Figura 7:	Medios de preparación	25
Figura 8:	Suspensión de esporas	26
Figura 9:	Suspensión cernida.....	26
Figura 10:	Inoculación del sustrato.....	26
Figura 11:	Inoculación del sustrato con una matriz sólida	27
Figura 12:	Arroz inoculado con cepa de <i>Metarhizium</i> spp.....	27
Figura 13:	Inoculación directa del sustrato.....	28
Figura 14:	Universidad Técnica de Cotopaxi	30
Figura 15:	Caja Petri con el 50% colonización de Hongo <i>Metarhizium</i> spp	31
Figura 16:	Caja Petri a los 7 días de colonización del hongo <i>Metarhizium</i> spp.	32
Figura 17:	Re-aislamiento del <i>Metarhizium</i> spp en PDA.....	33
Figura 18:	Incubación de <i>Metarhizium</i> en equipo Rebelk modelo R1-50, a 28 °C por un período de 7 días.	34
Figura 19:	Olla de cocina en estado de ebullición con 1000 ml de agua por libra de arroz .	35
Figura 20:	Arroz previamente escurrido sobre una superficie estéril	35
Figura 21:	Estetización en el auto clave Tuttnauer, del sustrato en la autoclave durante 20 minutos.	36

Figura 22: Preparación de sustrato de arroz colocado en fundas con cierre hermético y colocamos 15 ml solución de azúcar. (azúcar más agua destilada) por funda.....	36
Figura 23: Inocular el sustrato aplicando directamente 4 pedazos de 1 cm * 1 cm de <i>Metarhizium</i> , cerramos dejando un espacio de oxígeno, mezcle de manera que se dé una mezcla homogénea.....	37
Figura 24: Incubación del sustrato con una temperatura de 28°C.....	37
Figura 25: Trasladar el sustrato con el hongo reproducido al cuarto de crecimiento.....	38
Figura 26: Secado del sustrato en la incubadora a 28 °C, en 3 días	38
Figura 27: Vaso de precipitación con la solución madre, agitado en Stabletemp	39
Figura 28: Probetas con 50 ml de solución agitada y probeta con 100 ml de solución madre.....	39
Figura 29: Disoluciones seriadas	40
Figura 30: Distribución de 1 ml de sustrato de forma seriada en 5 tubos de ensayo o 5 soluciones.....	40
Figura 31: Cámara Neubauer	41
Figura 32: Observación de conidias en la solución –3 en la cámara de Neubauer a través del microscopio.....	41
Figura 33: Enfundado del producto final.....	43
Figura 34: Socialización de aplicación del Sustrato con <i>Metarhizium spp</i>	43
Figura 35: Entrega de la guía de propagación.	44
Figura 36: Entrega de las fundas de sustrato.	44

INDICE DE TABLA

Tabla 1: Plagas de importancia económica controladas con el hongo <i>Metarhizium</i> spp	18
Tabla 2: Materiales reactivos y equipos.	30
Tabla 3: Número de conidias por gramo de sustrato.....	42

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Propagación de *Metarhizium spp.* en sustrato vegetal (arroz precocido) obtenido del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), del cantón Sigchos parroquia Palo Quemado de la Provincia Cotopaxi, en los laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi 2023-2024”

Fecha de inicio: 13 noviembre 2023

Fecha de finalización: 01 febrero 2024

Lugar de ejecución:

- Laboratorios de la Universidad Técnica de Cotopaxi campus Salache

Facultad que auspicia

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Renovables

Carrera que auspicia:

Agronomía

Equipo de Trabajo:

Ing. Marco Antonio Rivera Moreno

Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

Ing. Tania Elizabeth Llanos Proaño

Alison Valeria Freire Guaman

Coordinador del Proyecto:

Nombre/s: Alison Valeria Freire Guaman

Teléfonos:0990136242

Correo electrónico: alison.freire8518@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura- Agricultura, Silvicultura y pesca- Producción Agropecuario

Línea de investigación:

Procesos tecnológicos, bioquímica, biomateriales, desarrollo y seguridad alimentaria.

Línea de vinculación de la carrera:

Bio insumos

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El uso de pesticidas químicos es perjudicial para el medio ambiente, para la salud humana y para la economía de los agricultores, por lo que se buscan alternativas a los pesticidas químicos para controlar las plagas. Otra forma de controlar químicamente diversas

plagas en los cultivos es utilizar hongos entomopatógenos. Ofrece muchos beneficios desde el punto de vista económico y medioambiental y es menos tóxico para los agricultores. A diferencia del control químico, que utiliza productos químicos comúnmente utilizados por los agricultores para controlar las plagas en los cultivos, se puede combinar con otros métodos de control como el cultivo y el manejo mixto de plagas. Sin embargo, estos métodos son costosos y afectan el medio ambiente y la vida de los agricultores.

Este proyecto de investigación busca una nueva alternativa mediante el uso de un biocontrolador como el *Metarhizium* spp., que permitan un manejo agroecológico y dar así una mejor alternativa del control de diferentes plagas para los agricultores en el Ecuador.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

3.1. Beneficiarios directos:

La Universidad Técnica de Cotopaxi, carrera de Ingeniería Agronómica junto a Maquita Cushunchic, trabajan en conjunto para realizar esta investigación y beneficiar a los socios de la caña de azúcar, de la zona de Palo Quemado.

3.2. Beneficiarios indirectos:

A todos los agricultores de caña de azúcar de cantón Sigchos, cantón Pangua y del cantón Quito.

4. PROBLEMÁTICA

Debido a que el uso de pesticidas químicos es perjudicial para el medio ambiente, la salud humana y la economía de los agricultores, se buscan alternativas a los pesticidas químicos para el control de plagas. Otro método de control químico de diversas plagas de cultivos es el uso de hongos entomopatógenos. Ofrece muchos beneficios económicos y ambientales y es menos tóxico para los agricultores. A diferencia del control químico, que utiliza productos químicos comúnmente utilizados por los agricultores para controlar las

plagas de los cultivos, se puede combinar con otros métodos de control, como la labranza y el control mixto de plagas. Sin embargo, estos métodos son costosos y afectan el medio ambiente y la vida de los agricultores. (Torres & Capote, 2004).

En el Cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi el daño causado por la plaga salivazo perjudica a los agricultores de la zona, debido a que la plaga succiona la savia de la xilema e inyecta ciertas toxinas, produciendo necrosis en el tejido parenquimatoso de la planta, al perforar sus partes verdes y succionar sus jugos ocasionando el retraso del crecimiento de los tallos, en algunas ocasiones con altos daños hasta llegar a la muerte de las plantas. Un problema de contaminación ambiental resulta del uso descontrolado de pesticidas químicos, mientras que los hongos entomopatógenos tienen potencial como agentes controladores de insectos para las plagas en el sector agrícola.

Según Sáenz (2015) manifiesta que el salivazo (*Mahanarva andigena*) es una plaga a nivel mundial que causa pérdidas en zonas grandes cultivadas en todo el sector de Sigchos con ataques severos en el cultivo de caña, de esta plaga se ha determinado el rendimiento de 115 T *(ha) bajando hasta los 75 T*(ha).

El uso de hongos entomopatógenos constituye una estrategia biológica ampliamente utilizada dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Los microorganismos en el suelo son corresponsables del suministro de elementos o compuestos inorgánicos nutricionales, orientados particularmente hacia las plantas superiores, así como la función específica de descomponer y mineralizar la materia orgánica que de una u otra forma se incorpora al suelo (Shah et al., 2005).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Propagar *Metarhizium spp.* en el sustrato vegetal (Arroz Precocido), obtenido del Cantón de Sigchos.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el mejor método de propagación de *Metarhizium* spp.
- Elaborar una guía para la reproducción de conidias de *Metarhizium* spp. de manera artesanal para los productores de caña de azúcar del sector de Sigchos.
- Determina la viabilidad de las cepas *Metarhizium* spp a los 6 meses.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS CON RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

PLANTEADOS

OBJETIVO 1	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Determinar el mejor método de propagación de <i>Metarhizium</i> spp.	Pesar 1 gramo de sustrato más 50 ml de agua destilada, agitar durante 15 minutos	A partir de 3 métodos de propagación como, suspensión de 1 gramo de sustrato, aplicación directa de conidias a partir de la caja petri y corte de la superficie de hongo 1 cm x 1 cm	Sustrato con un 30% de reproducción del hongo por funda.
	Aplicación directa de conidias a partir de la caja petri.		Sustrato con 10% de reproducción del hongo por funda
	Cuatro cortes de 1 cm x 1 cm de la superficie del hongo.		Sustrato con una reproducción del 100% del hongo por funda.
OBJETIVO 2	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Elaborar y socialización de la guía de producción de reproducción de conidias de <i>Metarhizium</i> spp. de manera	Recopilación de datos obtenidos en la elaboración de la guía.	Realización de una guía artesanal para la propagación del hongo, por medio de experimentos caseros elaborados en los laboratorios de la Universidad Técnica	Guía práctica para la elaboración del sustrato de <i>Metarhizium</i> spp.

artesanal para los productores de caña de azúcar del sector de Sigchos		de Cotopaxi.	
OBJETIVO 3	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Determina la viabilidad de las cepas <i>Metarhizium</i> spp. a los 6 meses.	Conteo de conidias en la cámara de Neubauer, toma de datos de la solución 10^3	Después de 6 meses de su elaboración se realiza una verificación de existencia de conidias en la funda de 20 g de sustrato.	Obtención del número exacto de conidias en la solución.

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Microorganismos del suelo

Dado que el suelo es un sistema dinámico, proporciona un hábitat muy heterogéneo para muchos microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y animales (Torres & Capote, 2004). Según Velázquez et al., 2002. En 1 gramo de suelo viven hasta 10 mil millones de microbios, de los cuales menos del 1% puede cultivarse. Las razones por las que los microorganismos no crecen en el medio de cultivo son la falta de señales, nutrientes o superficies, la cantidad de compuestos inhibidores, la combinación incorrecta de temperatura, presión, la creación de gases atmosféricos y la acumulación de productos tóxicos. Enfermedad fisiológica con crecimiento lento o rápida dispersión de colonias. (Sinú & Hagström, 2004)

Los microorganismos son importantes para mantener la función del suelo. Están involucrados en funciones clave como la formación del suelo, la descomposición de la materia orgánica, la desintoxicación y el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (P. Garbea, 2004). Además, pueden actuar como supresores de enfermedades de las plantas, transmitidas por patógenos del suelo (John W. Doran, 2000).

Existen muchas interacciones ecológicas entre microorganismos y plantas, como el parasitismo, la simbiosis, el mutualismo y la simbiosis (Zhang et al., 2018). Todas estas interacciones son de gran interés para los científicos que buscan identificar y comprender las

interacciones óptimas que favorecen el crecimiento de las plantas. Este crecimiento puede ocurrir debido a dos mecanismos: supresión de cepas microbianas patógenas y aumento de nutrientes del suelo. (Jacoby et al., 2017)

En los ecosistemas, la mayoría de los nutrientes como el nitrógeno, el fósforo y el azufre forman parte de la molécula de carbono, lo que limita su disponibilidad. Para acceder a estos nutrientes, las plantas dependen de microbios especializados del suelo que degradan orgánica y mineralmente los compuestos orgánicos y absorben nutrientes que luego se liberan cuando los microbios mueren. (Christopher B. Craft, 1997). Este proceso también incluye iones como amoníaco, nitrato, fosfato y sulfato, que son los mejores nutrientes para las plantas.. (Bender et al., 2016).

7.2. Distribución de los microorganismos del suelo

La ciencia que estudia la distribución de los seres vivos es la biogeografía, que se denomina estudio de la distribución de los organismos a través del espacio y el tiempo. El objetivo principal es determinar dónde viven los organismos, cuántos organismos hay y los factores ambientales que predicen o sustentan su existencia. (Bastan et al., 2009).

Los estudios de microorganismos, incluidas bacterias, arqueas, virus y hongos, han encontrado evidencia de patrones geológicos, algunos de los cuales se asemejan a organismos más grandes.(Jennifer B. Hughes Martiny, 2006).

Los estudios han demostrado que las características específicas se deben a la adaptación local, al aislamiento por la distancia o a ambos.(Aguirre-Acosta et al., 2014). Noah Fierre & Robert B. Jackson, 2005 mostramos que la diversidad bacteriana no está relacionada con la temperatura, la latitud y otras variables que afectan significativamente la diversidad de plantas y animales, y que la estructura de la comunidad es independiente de la distancia geográfica. Estas investigaciones muestran la complejidad de la distribución de los microbios, por lo que no todos los resultados son iguales y dependen del tipo de microbio, ubicación

geográfica, condiciones ambientales y vegetación presente. Diversidad de microorganismos del suelo

La diversidad se refiere al tipo y abundancia de especies microbianas. En términos biológicos, se puede definir como el número y distribución de diferentes secuencias en el ADN (ácido desoxirribonucleico) obtenido de muestras naturales.. (Torva & Vares, 2002). Las investigaciones moleculares indican que la diversidad de microorganismos en el suelo es mucho más amplia de lo que se puede discernir con técnicas de cultivo. Según (Nicholson y Hirsch, 1998), alrededor del 1% de los microorganismos pueden cultivarse con éxito en medios de cultivo.

También se considera beneficiosa la actividad microbiana en los suelos implicada en el ciclo del carbono y el nitrógeno, incluidas las interacciones simbióticas con las plantas. Se consideran peligrosas las actividades que producen óxidos de nitrógeno, emisiones de metano y enfermedades de las plantas (P. C. Brookes, 2006). La falta de conocimiento sobre el microbiota del suelo, la diversidad de la composición del suelo, la abundancia de taxones individuales (>10⁶) y la abundancia de células individuales (>10⁹) dificultan el estudio de los microorganismos del suelo; Es lo mismo. Comprender estas actividades e interacciones es fundamental (Singh et al., 2011).

7.3. Factores que influyen en la diversidad de microorganismos en el suelo

Las prácticas de manejo del suelo, como la rotación de cultivos, la labranza, la fertilización, el compostaje, la fertilización, el uso de pesticidas y el riego, pueden tener un impacto significativo en los parámetros microbianos del suelo (N. C. M. Gomes, 2001). La textura, el pH, la capacidad de intercambio iónico y la materia orgánica influyen directamente en la provisión de hábitats específicos para microorganismos específicos o afectan la función de raíces y brotes (Gelsomino et al., 1999). Esto sugiere que el tipo de suelo es un factor importante en la determinación de la microbiota de las raíces (Edwards & Thompson, 1973).

Según la información, la fertilidad del suelo, la vegetación y la altitud influyen en la abundancia y diversidad de hongos y bacterias (Pablo Cuevas-Reyes, 2003). Descubrieron que los suelos con buena fertilidad tenían una mayor diversidad de microorganismos que aquellos con baja fertilidad. Además, la aplicación de fertilizantes químicos a suelos ricos en materia orgánica aumenta la actividad enzimática de los microorganismos. Sin embargo, si la fertilización reduce el pH del suelo por debajo de cierto umbral, puede afectar negativamente a los microorganismos (Guísele & Show, 2014)

Muchas plantas liberan una variedad de compuestos al suelo a través de sus raíces, incluidos etileno, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, polisacáridos y enzimas (Christine M Eisenhauer, 2010), crea un entorno único para los microorganismos que viven en la rizosfera, que selecciona para la comunidad microbiana.. (Abawi & Widmer, 2000). Al determinar el impacto de la vegetación arbustiva en la vida microbiana (N. Eisenhauer, 2010), se determinó que se producen claros cambios estacionales en la composición de los arbustos 4 años después de la transición de los pastizales a los sitios de prueba. Las comunidades microbianas del suelo están influenciadas por la disponibilidad y calidad de la materia orgánica.

Según (Anu Escalonen, 2009), la composición de la comunidad microbiana es diferente debido a cambios en las propiedades del suelo que no están elevados ni en la vegetación. Sin embargo, (Burns et al., 2013) informaron que la vegetación tiene un efecto significativo en la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas en los paisajes de Alaska. El aumento de la altitud tiene un efecto negativo sobre los microorganismos, lo que significa que a mayores altitudes se produce una menor abundancia y diversidad (Achinero et al., 2012). Por ejemplo, la diversidad de comunidades bacterianas en el Himalaya disminuye a medida que aumenta la altitud (Nayak et al., 2012).

8. Microorganismos Benéficos

Los microorganismos que ayudan a eliminar plagas del suelo, son capaces de matar plagas que dañan los cultivos y ayudan a mantener el equilibrio químico del ecosistema.

(Christiansen et al., 2007).

8.1. Aplicación de los Microorganismos Benéficos:

- Es un componente importante de las enmiendas orgánicas y compost.
- Es un inoculante de leguminosas para fijar el Nitrógeno.
- Eliminan insectos y enfermedades de plantas.
- Ayudan a la incrementación de la calidad y productividad de los cultivos y con esto reducen las labores. (Boga et al., 2014)

8.2. Funciones de los Microorganismos Benéficos

- Degradación de agroquímicos.
- Fijación de nitrógeno atmosférico.
- Degradación de desechos orgánicos.
- Eliminación de patógenos del suelo y plantas.
- Incremento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas.
- Solubilización de fuentes de nutrientes insolubles. (Boga et al., 2014)

8.3. Importancia de los microorganismos benéficos

Los microorganismos que se encuentran en el suelo son los componentes más grandes del suelo y se convierten en la parte viva del suelo y son responsables de los cambios y el desarrollo. (Cervantes et al., 1994).

Las poblaciones microbianas del suelo entran en el marco de interacciones que afectan el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo, y participan en funciones fundamentales que aseguran la estabilidad y productividad de los agroecosistemas y el medio ambiente (Ayala-Zermeño et al., 2015).

Los microorganismos del suelo son responsables de las actividades específicas de descomposición y mineralización de sustancias orgánicas que han sido introducidas en el

suelo de una forma u otra, y proporcionan alimento a los elementos orgánicos, en o compuestos, especialmente para las plantas superiores (Shah et al., 2005).

9. Ciclo de vida salivazo (*Mahanarva andigena*)

La presencia de insectos está asociada a la época de lluvias, durante la época seca los insectos permanecen en estado latente como huevos. Tanto las ninfas como los adultos chupan la savia de las plantas, las ninfas se dañan más fácilmente que los adultos y en su forma de ninfa pueden debilitar las plantas o incluso volverse amarillas. El peor daño proviene de los adultos que chupan la savia de la planta e inyectan toxinas que interfieren con la fotosíntesis de la planta (Básica, 2012).

Los cercópodos muestran un patrón similar de parametabolismo, el ciclo de vida del huevo, la ninfa y el adulto del insecto, los juveniles y las ninfas son similares al de los adultos.(Cetino, 2008).

Según (CINCAE, 2004), este insecto presenta tres etapas de desarrollo: huevo, ninfa y adulto. En la forma adulta, la saliva es del tamaño de un insecto y difiere entre machos y hembras.

- El macho mide aproximadamente 11 mm de largo y 5 mm de ancho, de coloración castaño oscuro o negro con manchas amarillas bien acentuadas sobre las alas anteriores a manera de dos bandas transversales, el abdomen y las patas son rojizos.
- La hembra es ligeramente mayor que el macho (13 mm de largo y 6,5 mm de ancho), de color castaño, con las manchas amarillas un poco difusas.

9.1. Huevos

De acuerdo (Barroso-tagua, 2017) los huevos recién nacidos son de color blanco y amarillo claro con líneas de eclosión oscuras o negras. Tienen forma ovalada o fusiforme y miden alrededor de 1,3 mm de largo. El período de incubación es de 19 días, variando de 16 a 23 días..Ninfas

Según (ERCROS, 2014) El período ninfal consta de cinco etapas con una duración promedio de cada etapa de 8 a 14 días. El período larvario total es de 51 días, con variaciones entre 38 y 65 días. Las larvas jóvenes eclosionan en los cogollos, se alimentan del agua y quedan cubiertas por una masa espumosa. Y algunos enemigos naturales. Durante el último estadio, las ninfas migran a la vaina vieja del tallo y permanecen allí hasta la edad adulta. Así, el ciclo de vida de (*Andigena Mahanarva*) dura 70 días, con una variación de 57 a 84 días desde la fertilización hasta la madurez, lo que indica que puede sufrir muchos cambios cuando se le dan las condiciones ambientales adecuadas. Puede ocurrir en varias generaciones a lo largo del año.

9.2. Adultos

Los adultos descansan sobre las hojas de las plantas durante el día, especialmente las que están cerca o en los cogollos. De acuerdo (CINCAE, 2022) Estos últimos son más frecuentes cuando la parte superior está clara, en ocasiones se encuentran debajo de cortezas viejas o cerca del suelo. En este caso, se trata de un adulto recién surgido o de una hembra que se acerca a la fase reproductiva. Las hembras ponen huevos en vainas viejas a lo largo de los tallos, especialmente en la base de las cañas, más cerca del suelo, y producen hasta 153 huevos por temporada de reproducción (de 12 a 37 días).

9.3. Ingreso de plaga salivazo (*Mahanarva andigena*)

Los primeros registros de esta plaga en el cultivo de caña de azúcar datan de 1968 (Archivos del Ingenio San Carlos). Actualmente se encuentra distribuida irregularmente en el país, habiendo sido reportada su presencia en varios sectores de la cuenca baja del Guayas (Naranjito, Bucay, Milagro y La Troncal), El Oro (Zaruma y Piñas), Sucumbíos y Pastaza (Puyo). Hasta ahora se han identificado dos especies asociadas a la caña de azúcar:

Mahanarva andigena y *Mahanarva trifissa* (Balaram Naik, P Karunakar, 1 M Jayadev, 2013)

9.4.Hábitos y daños.

Las adultos y ninfas absorben la savia de la planta. Según (Mundial, 2013) Las ninfas son menos dañinas que los adultos y pueden hacer que las plantas se debiliten o se pongan amarillas durante un corto período de tiempo. Si las ninfas están presentes en las partes aéreas de la planta, los tallos infectados mostrarán una masa húmeda y pegajosa de azúcar, que se tornará blanca cuando se seque la savia. Las raíces se infectan y contaminan, afectando la absorción de agua y nutrientes de la planta. El peor daño proviene de los insectos adultos que chupan el agua e inyectan toxinas que alteran la fotosíntesis de la planta. Los primeros síntomas son manchas cloróticas o amarillas alrededor del área de la picadura, y luego las hojas se secan y se queman. En general, el daño varía según el tipo de aguja, las características físicas de la caña y el clima. Además de la serie de daños encontrados en obra, también se deben considerar las pérdidas encontradas a nivel de fábrica. Esto significa: se reduce el contenido de sacarosa, se aumenta el contenido de fibra, la sacarosa se convierte en glucosa y levulosa (Balaram Naik, P Karunakar, I M Jayadev, 2013)

9.5.Distribución

Según (Mundial, 2013), ha reportado a nivel mundial la presencia de *Mahanarva andigena* en los países como México, BÉlice, Guatemala, Honduras y Brasil, así como en el Ecuador particularmente en la Cuenca Baja del Guayas (Naranjito, Milagro, Bucay), Zaruma, Piñas (El Oro), Puyo (Pastaza) y Nanegalito (Pichincha).

9.6.Temperatura y humedad

De acuerdo con (Cuaran et al., 2012), La temperatura y la humedad son factores que afectan la longevidad de las polillas salivales (*Mahanarva andigena*). Condiciones de hábitat para huevos, ninfas y adultos, temperatura 20-35 °C, humedad 50-80 °C. (%)), las condiciones climáticas tienen una gran influencia en sus ciclos de vida, debido a que no toleran climas templados.

El estudio se realizó en la provincia de Pastaza, donde se cultiva caña de azúcar. El clima es cálido y húmedo, variando según el nivel climático, la precipitación anual es de 4.576,14 mm, la humedad media anual es de 88,30%, el promedio de horas de sol al día de 1.076 horas, la temperatura mínima de 15,25 °C y la temperatura anual promedio de 15,25 °C. temperatura de 25°C. (Valle Ramírez et al., 2015).

9.7. Daños causados por el salivazo (*Mahanarva andigena*)

El salivazo es una de las plagas más importantes de los cultivos de caña de azúcar en Estados Unidos y muchos países del Caribe. El primer registro de saliva en azúcar fue en 1968 en la Azucreira de San Carlos. En los últimos años esta plaga ha aumentado significativamente afectando 2000 hectáreas en diferentes puntos del estado de Guayas ,Cañar ,Pichincha (Mora, 2000).

La malas prácticas fitosanitarias y la falta de conocimientos técnicos son evidentes en el cultivo de la caña de azúcar, y los pequeños agricultores no prestan mucha atención al control de plagas y subestiman su impacto en el proceso de elaboración del azúcar y sus productos, especialmente la panela. es un problema y azúcar. (Rafael et al., 2016).

Hasta un 40-60% de las enfermedades de las glándulas salivales afectan a los productores de caña de azúcar de la región, debido a la búsqueda de nuevas formas de controlar la plaga sin contaminar el medio ambiente y la salud humana (Coeto, 2015)

10. Microorganismos Benéficos

Los microorganismos que ayudan a eliminar plagas del suelo, son capaces de matar plagas que dañan los cultivos y ayudan a mantener el equilibrio químico del ecosistema (Kristiansen et al., 2007).

10.1. Aplicación de los Microorganismos Benéficos:

- Ayudan a la incrementación de la calidad y productividad de los cultivos y con esto reducen las labores
- Es un componente importante de las enmiendas orgánicas y compost.

- Eliminan insectos y enfermedades de plantas. .
- Es un inoculante de leguminosas para fijar el Nitrógeno.
- (Boga et al., 2014)

10.2. Funciones de los Microorganismos Benéficos

- . Eliminación de patógenos del suelo y plantas.
- Incremento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas.
- Degradación de desechos orgánicos.
- Solubilización de fuentes de nutrientes insolubles
- Fijación de nitrógeno atmosférico.
- Degradación de agroquímicos. (Boga et al., 2014)

10.3. La importancia de los microorganismos benéficos

La mayor parte del suelo está conformado por microorganismos y son responsables del cambio y desarrollo de este. (Cervantes et al., 1994).

Las poblaciones microbianas del suelo entran en el marco de interacciones que afectan el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo, y participan en funciones fundamentales que aseguran la estabilidad y productividad de los agroecosistemas y el medio ambiente (Ayala-Zermeño et al., 2015).

Los microorganismos del suelo son responsables de las actividades específicas de descomposición y mineralización de sustancias orgánicas que han sido introducidas en el suelo de una forma u otra, y proporcionan alimento a los elementos orgánicos, en o compuestos, especialmente para las plantas superiores (Shah et al., 2005).

11. Ecología de *Metarhizium* spp.

Metarhizium spp es un hongo del suelo que consta de varios genotipos distribuidos en todo el mundo, desde el Ártico hasta los trópicos. Actualmente no existe ningún registro conocido que asocie al *Metarhizium* spp como un hongo aéreo (Zimmermann, 2007).

Se han desarrollado métodos para el estudio de la distribución y la densidad. Para la "recolección de hongos" o el análisis cualitativo del suelo se utiliza el "método de cebo de laboratorio" (Zimmermann, 1993). Las larvas de gusanos son susceptibles a las enfermedades fúngicas, por lo que se utilizan como cebo para insectos colocándolas en muestras de suelo

Muchos factores bióticos y abióticos influyen en la capacidad de los hongos entomopatógenos para infectar a sus huéspedes y persistir en el medio ambiente. Estos incluyen enemigos potenciales, comportamiento, apariencia física y edad del huésped, vida y edad del patógeno; Secado solar, temperatura, humedad y presencia de pesticidas, bandeja de inóculo (Butt et al., 1994)

El establecimiento y la persistencia de *Metarhizium* spp son esenciales para el manejo exitoso del agente. Esto y la capacidad de estar activo en el medio ambiente pueden definirse como fortalezas ambientales (Noah Fierer y Robert B. Jackson, 2005). Los suelos parecen ser sitios ideales para la aplicación de inóculos fúngicos, pero son un tema muy complejo con composición mineral, textura y estructura variables y presentan un entorno altamente competitivo (Keller et al., 2003).

Este hongo se utiliza no solo para plagas, sino también para evaluar efectos no deseados y preparar una evaluación de riesgos al aplicar plagas de hongos. Se sabe que *Metarhizium* spp infecta una amplia variedad de insectos de diferentes órdenes, por lo que se debe prestar atención al nivel del filo.

La mayoría de los insectos del género *Metarhizium* pertenecen al orden Coleoptera, particularmente en los insectos terrestres. Algunas cepas y genotipos son más restrictivos (Ferrón, 1978). Jaronski y Jackson (2008) informaron que estos aislamientos son altamente específicos en condiciones de campo a diferencia con estudios de laboratorio. Las cepas de hongos entomopatógenos difieren en virulencia, persistencia, rango de huéspedes y otros

criterios como temperatura óptima, resistencia a los rayos UV y capacidad de crecer y brotar. y la capacidad de producir esporas.

En general, especies específicas muestran un alto nivel de especificidad por las especies de las que se separan (Lace et al., 1995). Se cree que las interacciones entre plagas y patógenos son parte de un proceso adaptativo a largo plazo. (Noah Fierer & Robert B. Jackson, 2005).

La mayoría de estos estudios se realizaron en el laboratorio exponiendo insectos a un inóculo fúngico definido (susceptibilidad fisiológica) (Inglis et al., 2008). Sin embargo, para aplicaciones de campo, la sensibilidad ecológica y la resolución son esenciales para obtener resultados de calidad.

Zimmermann, (2007) Llegó a la conclusión de que, sobre la base de los conocimientos actuales *Metarhizium spp* se considera seguro, con riesgos mínimos para los vertebrados, los seres humanos y el medio ambiente.

12. La clasificación de la taxonómica de *Metarhizium spp*

Metarhizium spp es un hongo entomopatógeno incompleto de la clasificación de *Ascomycota*, *Sordariomycetes*, *Hypocreales* y *Clavicipitaceae*, caracterizado por la reproducción femenina atacando a varias especies de insectos, incluida la *saliva nativa de Mahanarva*.(Gaitán, 2018).

- Reino.....Fungi
- División.....Ascomycota
- Clase.....Sordariomycetes
- Orden.....Hypocreales
- Familia.....Clavicipitaceae
- Subfamilia.....Tillandsioideae
- Género.....*Metarhizium*.

Clasificación taxonómica del *Metarhizium spp*, (Saputri, 2016).

12.1. Donde se encuentra el hongo *Metarhizium spp*

El hongo *Metarhizium spp* está ampliamente distribuido en el medio ambiente y puede encontrarse en el suelo, la paja, el estiércol, las plantas y los insectos. Este hongo es uno de los cinco primeros microorganismos utilizados en control biológico y es uno de los más extendidos a nivel mundial. (Monzón, 2016).

12.2. Plagas que ataca el hongo *Metarhizium spp*

Las especies de *Metarhizium spp* de diversos órdenes atacan a más de 300 especies de insectos. Entre las plagas afectadas por este hongo se encuentra la caña de azúcar (Aeneolamia). Los insectos asesinados por este hongo quedan completamente cubiertos de micelio. El micelio es blanco al principio, pero se vuelve verde cuando el moho forma esporas. (Gonzales et al., 2012).

Tabla 1: Plagas de importancia económica controladas con el hongo *Metarhizium spp*

Cultivo	Plaga	Hongos entomopatógenos
Café	Broca y Minador	<i>Metarhizium spp.</i>
Caña de azúcar	Salivazo	<i>Metarhizium spp.</i>
Diversos cultivos	Artrópodos	<i>Metarhizium spp.</i>

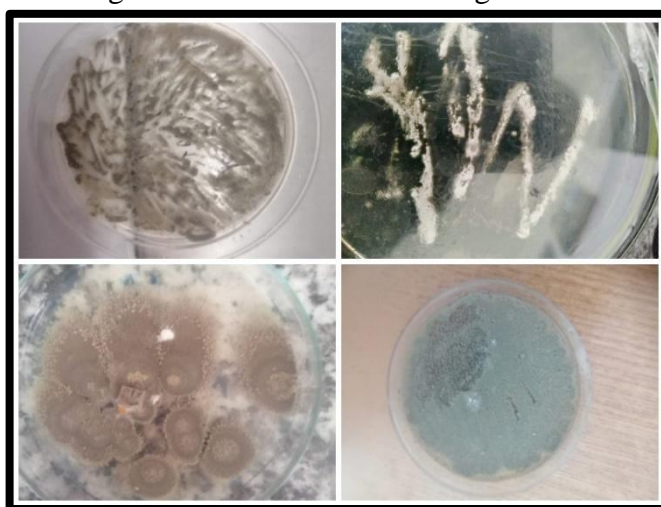
Fuente : (Pacheco et al., 2019).

12.3. Características del hongo *Metarhizium spp*

Todas las colonias están unidas al medio, son de forma redonda y todas de color verde. esto sucede en un color separado. Las conidias son ramificadas, con 2 a 3 ramas por septo, de 4 a 14 μm de largo y de 1,5 a 2,5 μm de ancho (Gaitán, 2018). Los pilides tienen forma de

maza, son cilíndricos y se estrechan en el ápice. Pueden medir de 6 a 13 μm de longitud y de 2 a 4 μm de diámetro. Por lo general, se incluyen conidios que miden de 3 a 9 μm de longitud y de 1,5 a 3,5 μm de diámetro y diámetro. La humedad y temperatura son importantes para la infección del hongo y la formación de esporas en presencia de sustancias extrañas. La germinación se produce después de 12 horas a una temperatura de 23-30 °C y una humedad del 90 % o más. (Valencia et al., 2011).

Figura 1: Cultivo del hongo *Metarhizium* spp.



Elaborado por: Freire A.(2023)

12.4. Mecanismos de acción del hongo *Metarhizium* spp

Para que los hongos entomopatógenos se desarrollen en el huésped, realizan los siguientes pasos: reproducción, construcción de un agujero, formación de estructuras internas, colonización y reproducción. El inóculo, o unidad infecciosa, incluye estructuras reproductivas y reproductoras, es decir, esporas y conidias (Islas, 2015). Este proceso comienza cuando la espora se adhiere a la piel del insecto, produciendo un tubo germinal y un tubo adicional que sujeta las tijeras en su lugar para facilitar la penetración en el insecto.

12.5. En la penetración participan dos mecanismos:

El primero es el cuerpo, que destruye el músculo, la zona de la membrana de la cutícula. El segundo mecanismo químico es la acción de enzimas (proteasas, lipasas y quitinasas) que degradan el tejido en el punto de penetración. (Mejía, 2016).

Las hifas se expanden y ramifican en el tejido del insecto, ocupando todo el cuerpo del insecto (Bustillo y Castro, 2011). El hongo *Metarhizium* spp tiene las siguientes características. Cuando se cultiva en un medio PDA, esta especie muestra micelios con bordes blancos y los grupos de conidios cambian de color.

Muestra un aspecto que varía del verde oliva al verde amarillento, miel o amarillo pálido, con una extensión amarillenta en el centro del molde.

- Su aspecto es algodonoso.
- Su reproducción es asexual.
- Es un bio controlador de diferentes cultivos (Quesada-Béjar, 2020).

12.6. Modo de Acción de *Metarhizium* spp

Este hongo se adhiere a la piel del insecto y entra por sus partes blandas, por la boca. Una vez que se encuentran en un insecto, las esporas crecen y producen una toxina que mata al huésped cada 3 o 4 días. Los síntomas que presentan los insectos incluyen irritabilidad, inquietud y parálisis. Dependiendo de las condiciones de humedad, el ciclo comienza nuevamente, el insecto se cubre de micelio y produce esporas, que son transportadas por el viento y la lluvia, infectando a otros insectos (Quesada-Béjar, 2020).

12.7. Especies sensibles al Hongo *Metarhizium* spp

Metarhizium spp es un hongo entomopatógeno capaz de matar insectos como trips, ácaros y babosas. Este tipo de hongo tiene un gran potencial en sistemas para eliminar insectos resistentes a pesticidas comunes. Este tipo de seta se puede utilizar en agricultura y

cultivo convencional. Puede utilizarse con insecticidas sistémicos, herbicidas y fertilizantes foliares. (Kristiansen et al., 2007).

13. Recolección de muestras en el campo

Para obtener cepas de entomopatógenos, la recolección se realiza a partir de campos de insectos infectados que presentan signos o síntomas del patógeno a aislar (micelio o esporulación). Estos insectos se transportan individualmente al laboratorio en contenedores, cajas o bolsas de plástico. Aquí, la muestra se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5% durante 2 minutos y se lava tres veces con agua desionizada (DE) para su desinfección. Luego colóquelo sobre papel de filtro esterilizado para eliminar el exceso de humedad. Luego de esterilizar la muestra, la muestra inoculada se coloca en una placa de Petri colocada en una cámara húmeda con papel de filtro, hisopos humedecidos y dos portaobjetos colocados en forma de cruz.

Figura 2: Captura de insectos con conidias de *Metarhizium* spp



Crecimiento de micelio

Esporulación de *Metarhizium* spp. Sobre adultos de *Perkinsiella saccharicida*

Fuente : (Alcantara-Vargas et al., 2020)

14. Aislamiento

Para el aislamiento, los insectos se recolectan en una cámara húmeda que muestra la consistencia de la esporulación y la ausencia de contaminación. Esta separación se puede realizar de dos formas. En el primer caso, se extraen los conidios del cuerpo del insecto y se colocan en una botella para preparar una suspensión. A partir de esta suspensión, la siembra se realiza utilizando asas de platino en el medio de cultivo (Burns et al., 2013)

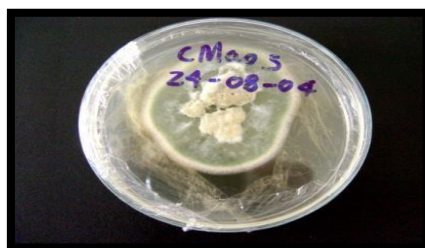
En otros casos, los conidios del insecto se eliminan mediante asas de platino y se esparcen por el medio de cultivo mediante la técnica fluorescente. La separación se realiza en placas de Petri o tubos de ensayo que contienen PDA (patata, dextrosa, agar) y extracto de levadura. Agregue una gota de ácido láctico al medio de cultivo en cada placa de Petri o tubo de ensayo para evitar el crecimiento bacteriano. Las cajas de Petri se sellaron con Parafilm y los tubos de ensayo se sellaron con algodón y papel de aluminio. Luego se coloca en una incubadora a 27°C con luz constante (AlcantaraVargas et al., 2020, 2020; Tupe et al., 2017)

Figura 3: Insecto cubierto de micelio de *Metarhizium* spp



Fuente : (Benjamin et al., 2002)

Figura 4: Aislamientos de *Metarhizium* spp en la caja Petri



Fuente : (Benjamin et al., 2002)

Figura 5: Aislamientos de *Metarhizium* spp en tubo de ensayo



Fuente : (Benjamin et al., 2002)

El cultivo se realiza para aislar o cultivar hongos para uso inmediato o para supervivencia a corto plazo. La siembra y aislamiento de cultivos puros implica permitir que el hongo seleccionado crezca en condiciones que favorezcan el desarrollo y la formación de esporas (Alcantara-Vargas et al., 2020)

Para ello, deberás verter el medio de cultivo, enfriarlo, fermentarlo y vaciar las setas que planeas plantar. Se puede realizar mediante punto simple o punto continuo con aguja o ganchillo. Para la siembra se utilizan platos, tubos y recipientes. (Amerasan et al., 2016)

Después de la siembra se sellan los platos, tubos y recipientes, se colocan los dátiles y se incuban el tiempo necesario hasta que crece el moho y se forma la flor. Las conidias se cultivan en medio de agar papa-dextrosa (PDA) en placas de Petri (9,0 × 1,5 cm) durante 10 a 12 días en una cámara de crecimiento de DBO. Temperatura 26°C, HR > 60%, ajuste 12 horas. (Alcántara-Vargas et al., 2020).

Colonia de *Metarhizium* spp en caja Petri con medio PDA a los 10 días de incubación a 26 °C por 12 h de foto fase. (Alcantara-Vargas et al., 2020)

Figura 6: Placa petri con conidias de *Metarhizium spp*



Elaborado por: Freire A.(2023)

15. Protocolo de replicación.

Se elaboro mediante la búsqueda de información una guía sencilla para replicar en laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi

15.1. Reactivación

Es necesario mantener la patogenicidad y virulencia de este organismo mediante su reintroducción dos veces al año, comenzando con cepas seleccionadas, ya sean autóctonas o introducidas. El método de ataque es liberar la superficie del hongo con la curva de plantación. Luego se raspa la superficie del PDA, se inyecta en una placa de Petri y se expone a la humedad y a los alimentos hasta que crece el moho. Después de eso, colóquelo sobre papel de filtro para eliminar el exceso de humedad y transfíralo a una sala de crecimiento o incubadora a 25°C y plena luz durante 15 días. Durante este periodo se completa el desarrollo del hongo y se controla completamente la formación de la espora. (Dimbi et al., 2003)

Una vez que los hongos han formado esporas y permanecen en la incubadora, se retira el parásito de la placa de Petri para reducir la humedad de la colonia y mejorar el intercambio de aire. Puedes guardar esta caja en el frigorífico (entre 4 y 8 °C) hasta por seis meses. (Benjamin et al., 2002)

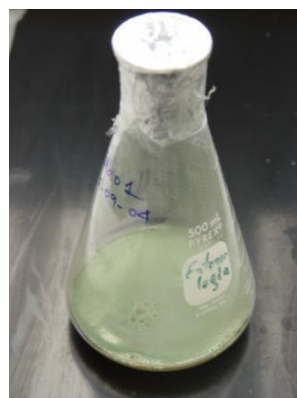
15.2. Preparación de matrices

Si el hongo forma esporas y permanece en la incubadora, se retiran los restos de la caja de Petri para reducir la humedad de la colonia y mejorar el intercambio de aire. Esta caja se puede conservar en el frigorífico (4-8°C) hasta por seis meses. (Dimbi et al., 2013; Ferron, 1978)

Figura 7: Medios de preparación



Producción de inóculo en la caja petri.



Matrices sólidas para producción de *Metarhizium spp*

Fuente : (Alcantara-Vargas et al., 2020)

16. Preparación del sustrato

Para la preparación del sustrato de hongo se utiliza arroz precocido, se coloca arroz en una olla en ebullición, durante 2 minutos , el arroz debe romperse con facilidad, posteriormente se debe cernir, para eliminar el exceso de la humedad y enfriarlo.

Se puede colocar en embaces de vidrio o de aluminio, se esteriliza en el auto clave a 121°C durante 30 minutos. (Chelvi et al., 2011)

16.1. Inoculación del sustrato con una suspensión de esporas

Las fundas son inoculadas con una suspensión de esporas resultadas a partir de la matriz (inóculo madre) de 50 ml más el contenido de una caja Petri inoculada, con una

agitación de 15 a 20 minutos formando una mezcla homogénea, cernir antes de aplicar en cada bolsa, las cuales deben ser inoculadas utilizar una jeringa previamente esterilizada Granda (2006, pág. 20).

Durante un periodo de 7 días las bolsas fueron incubadas a una temperatura de 25°C , las mismas que fueron revisadas de manera periódica para la identificación de las fundas libres de contaminación.(Granda, 2006, pág. 21).

Figura 8: Suspensión de esporas



Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 9: Suspensión cernida



Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 10: Inoculación del sustrato.



Elaborado por: Freire A (2023)

16.2. Inoculación del sustrato matriz sólida

A partir de cada matriz sólida se prepara 1cm *1cm de superficie del hongo, 5 ml de agua destilada con 5 gr de azúcar.

Figura 11: Inoculación del sustrato con una matriz sólida



Elaborado por: Freire A (2023)

Las fundas inoculadas se trasladan a la incubadora durante 3 días sin luz a 25 ° C, posterior movilización a el cuarto de crecimiento, donde reciben una fase de luz a una temperatura de 26 a 28 °C. En el tercer día se da movimiento al contenido de las fundas logrando una buena esporulación y un crecimiento uniforme. Trascurrido 10 días el sustrato se mueve a el cuarto de secado. (Barajas et al., 2010)

Figura 12: Arroz inoculado con cepa de *Metarhizium* spp

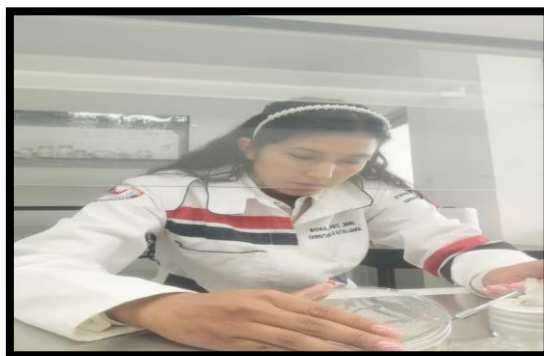


Elaborado por: Freire A.(2023)

16.3. Inoculación directa de conidias a partir de la caja petri

La inoculación directa debe ser obtenida de conidias de un cultivo fresco en esporulación, agregándole agua destilada. Con el asa de siembre se debe remover el micelio para que se mezcle con el agua. Agitar enérgicamente para su homogeneización (Cañedo V., Ames T. 2004).

Figura 13: Inoculación directa del sustrato



Elaborado por: Freire A.(2023)

17. Secado del producto

El sustrato proveniente del cuarto de secado que estaba a una temperatura no mayor a 28°C, se debe traspasar aun cuarto que tenga acondicionador de aire, lo cual ayuda al secado

del sustrato. El sustrato es depositado en bandejas de aluminio para ser aplicado de manera directa al campo o ser conservado a temperatura ambiente, permaneciendo de manera viable durante 6 meses.

18. HIPÓTESIS.

18.1. Hipótesis nula.

Metarhizium spp no se reproduce en sustrato de arroz precocido bajo condiciones de laboratorio.

18.2. Hipótesis alternativa.

Eficaz reproducción del *Metarhizium* spp en el sustrato de arroz precocido, bajo condiciones de laboratorio.

19. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

19.1. Tipos de investigación

19.2. Investigación bibliográfica.

Consiste en la recopilación de material bibliográfico, existen como artículos científicos, libros, tesis, documentos, entre otros con respecto al tema de estudio sobre agentes biocontroladores, se analizó y destacó lo más importante para la construcción de nuevos conocimientos para el desarrollo del documento del proyecto de investigación.

20. Métodos de Investigación

20.1. Cualitativo

Se utilizaron las claves taxonómicas de los hongos para la identificación de los agentes patógenos al utilizar el microscopio observando la morfología del hongo fitopatógeno.

21. Técnicas de Investigación

Observación directa

Crecimiento de *Metarhizium* spp en cada funda de arroz precocido

22. METODOLOGÍA

22.1. Ubicación de la investigación.

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi campus Salache, en el cantón Latacunga, al suroeste de la cabecera cantonal, en el km 7,53 junto a la E35 de la carretera que va vía Salache la cual está ubicado a una altura de 2,870 msnm (GPS, 2020).

Figura 14: Universidad Técnica de Cotopaxi



Fuente : (Googole maps, 2023)

22.2. Materiales, reactivos y equipos

Tabla 2: Materiales reactivos y equipos.

Materiales	Cantidades	Equipos	Cantidades	Reactivos	Unidades
Caja Petri	40 unidades	Autoclave	1 unidad	PDA(Hongos)	
Estuche de disección	1 unidad	Balanza analítica	1 unidad	Alcohol al 96 %	15 lts
Fundas de cierre hermético	100 unidades	Agitador de mezclas	1 unidad	Cloro	10 lts
Arroz precocido	7500gr 16,53 lb	Incubadora	1 unidad	Agua destilada	5000 ml
Azúcar	453,59gr 1 lb	Cámara de flujo laminar	1 unidad		

Papel aluminio	4 rollos	Cámara de Neubauer	1 unidad
Mechero	1 unidad		
Jeringuilla de 10 ml	4 unidades		
Guantes quirúrgicos	50 unidades		
Rotulador	2 unidades		
Colador	1 unidad		
Micropipetas	10 unidades		
Tubos de ensayo	5 unidades		
Gotero	1 unidad		
Papel film	30 metros		

Elaborado por Alison Freire 2023

22.3. PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN

22.3.1. Crecimiento del hongo *Metarhizium*

Dos días después de la inoculación del hongo, la colonización del 50% de la placa de Petri dio como resultado la formación de colonias con una apariencia filiforme blanca, los hongos más pequeños en el primer crecimiento de la placa de Petri.

Las colonias se expandieron al 100% por toda la caja de petri y fueron de color blanco tornándose verde claro en el medio de la caja de petri (García-Gutiérrez et al., 2020), y las semillas que mostraron son: Al inicio del desarrollo, Las La colonia es blanca, que se convierte en un polvo verde durante el crecimiento micelial.

En esta etapa, todas las colonias son verdes. En otras palabras, el color cambiará gradualmente a medida que se acerque a la etapa de formación de esporas.

Figura 15: Caja Petri con el 50% colonización de Hongo *Metarhizium* spp



Elaborado por: Freire A.(2023)

Después de 7 días de crecimiento, todas las colonias se volvieron verdes y (Raymundo-Jiménez et al., 2019) informaron que la apariencia permaneció parecida a la del algodón y formó una semilla verde cerca de la zona madura. El comienzo de la fase de esporulación muestra hifas y conidias suaves e interconectadas que varían en tonos desde el verde oliva hasta el verde claro. Como se reporta en (Torres de la C. et al., 2013), la cepa aislada mostró inicialmente colonias blancas, que se tornaron de color verde oliva al madurar, colonias blandas o con forma de matraz. Conidios agresivos. Los conidios ovoides a cilíndricos de 5-9 μm de largo, dispuestos en cadenas paralelas apretadas, son todos de color verde oliva y confirman que los hongos aislados de las muestras recolectadas son *Metarhizium* spp.

Figura 16: Caja Petri a los 7 días de colonización del hongo *Metarhizium* spp.



Elaborado por: Freire A.(2023)

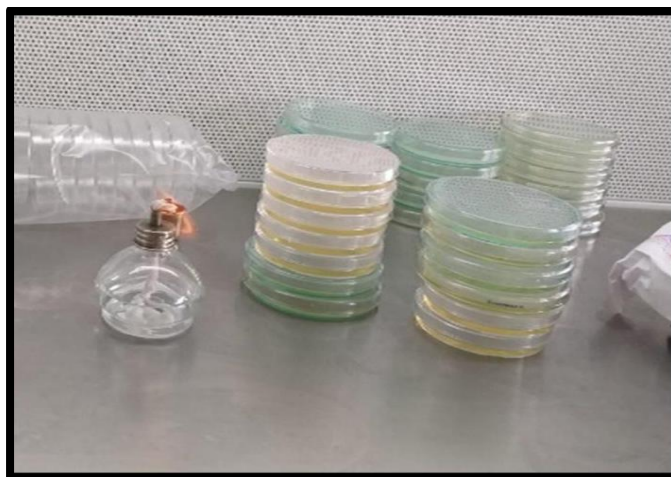
22.3.1. Re-aislamientos del Hongo almacenado en el laboratorio de Microbiología

La purificación es la recolección de la parte en crecimiento del hongo identificado, lo que se denomina limpieza con la punta de crecimiento y limpieza con el método de vacío. Plante una capa o naranja del hongo que se usará inmediatamente o se almacenará por un corto período de tiempo.

La siembra y el aislamiento en cultivo puro implican permitir que el hongo seleccionado crezca en condiciones que favorezcan el desarrollo y la formación de esporas. Para ello verterlo de la forma habitual, dejar enfriar y fermentar y añadir una pizca de setas antes de sembrar. Se puede realizar mediante punto simple o punto continuo con aguja o ganchillo. Básicamente, los platos se utilizan para sembrar.

Después de la siembra, selle el plato, colóquelo al sol y déjelo en remojo durante el tiempo necesario para que el hongo se desarrolle y produzca flores. Las conidias se cultivan en medio de agar papa-dextrosa (PDA) en placas de Petri (9,0 × 1,5 cm) durante 10 a 12 días en una cámara de crecimiento de DBO. Temperatura 26 °C, HR > 60%, ajuste 12 horas.

Figura 17: Re-aislamiento del *Metarhizium spp* en PDA



Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 18: Incubación de *Metarhizium* en equipo Rebelk modelo R1-50, a 28 °C por un período de 7 días.



Elaborado por: Freire A.(2023)

22.4. Proceso de producción del sustrato

El 94% del arroz es principalmente almidón. Contiene un 77,4% de hidratos de carbono, un 7,5% de proteínas y un 1,9% de lípidos. (Noboa & Quelal, 2014).

Para la esporulación y viabilidad, se debe realizar en un sustrato que tenga alto contenido de humedad , proteínas y un porcentaje intermedio de fibra (Aceves, 2008, pág. 187).

Para la producción masiva de la masa se utiliza arroz precocido (7500 g), mediante este dispositivo se coloca el arroz en una olla con agua hirviendo durante 2 minutos.

El arroz tiene una textura masticable y se rompe fácilmente. Luego transfiera el arroz a un colador para eliminar la humedad y enfríe.

Figura 19: Olla de cocina en estado de ebullición con 1000 ml de agua por libra de arroz



Elaborado por: Freire A.(2023)

El arroz precocido se coloca fundas de polipropileno, botellas de vidrio o bandejas de aluminio. En este caso se utilizará secciones de aluminio de 20 cm * 30cm con capacidad para 150 g de arroz preco

Figura 20: Arroz previamente escurrido sobre una superficie estéril



Elaborado por: Freire A.(2023)

Previamente con guantes quirúrgicos, se envuelve el arroz de manera que no quede visible, una vez que este así se esteriliza durante 20 minutos a 121 °C. Después de ser esterilizado, se traslada a la cámara de flujo para su enfriamiento. Posteriormente se traslada

el arroz a fundas con cello hermético. (Guía de laboratorio de microbiología Universidad Técnica de Cotopaxi)

Figura 21: Estetización en el auto clave Tuttnauer, del sustrato en la autoclave durante 20 minutos.



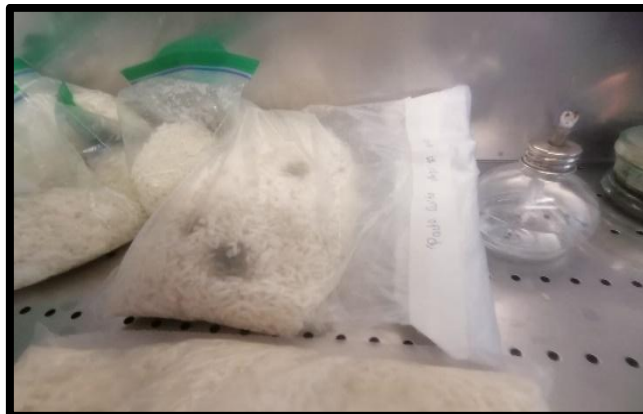
Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 22: Preparación de sustrato de arroz colocado en fundas con cierre hermético y colocamos 15 ml solución de azúcar. (azúcar más agua destilada) por funda



Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 23: Inocular el sustrato aplicando directamente 4 pedazos de 1 cm * 1 cm de *Metarhizium*, cerramos dejando un espacio de oxígeno, mezcle de manera que se dé una mezcla homogénea.



Elaborado por: Freire A(2023)

Figura 24: Incubación del sustrato con una temperatura de 28°C.



Elaborado por: Freire A. (2023)

Figura 25: Trasladar el sustrato con el hongo reproducido al cuarto de crecimiento



Elaborado por: Freire A.(2023)

22.5. SECADO DEL SUSTRATO

El sustrato del cuarto de crecimiento se debe colocar en la incubadora a una temperatura de 28°C, con baja humedad y sin luz. El material se esparce en bandejas de aluminio de 10x10 manteniéndose por 3 días, hasta que el contenido de humedad descienda al 12 ó 14%. En estas condiciones el material es enfundado en recipientes de 150 gr , se puede aplicar de manera directa en campo o guardar a temperatura ambiente durante 6 mese.

Figura 26: Secado del sustrato en la incubadora a 28 °C, en 3 días



Elaborado por: Freire A.(2023)

23. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

23.1. PRUEBA DE VIABILIDAD DE CONIDIAS EN EL SUSTRATO

23.1.1.1. Concentración de Conidias

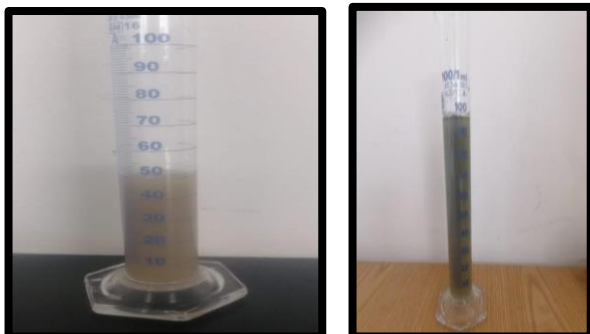
- a) Para el conteo de conidias se pesa 1 gr de sustrato, se procede a poner 50 ml de agua destilada en un vaso de precipitación, se coloca 1 gr de sustrato y utilizamos un agitador para tener una mezcla homogénea, transcurrido 15 minutos colamos la solución y la vertemos en 50 ml más de agua destilada para si obtener la solución madre.

Figura 27: Vaso de precipitación con la solución madre, agitado en Stabletemp



Elaborado por: Freire A.(2024)

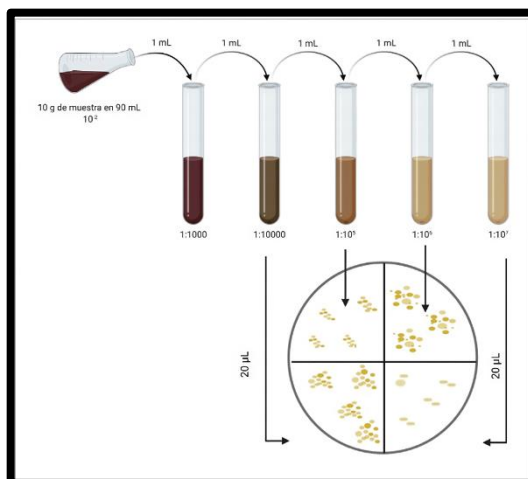
Figura 28: Probetas con 50 ml de solución agitada y probeta con 100 ml de solución madre.



Elaborado por: Freire A.(2023)

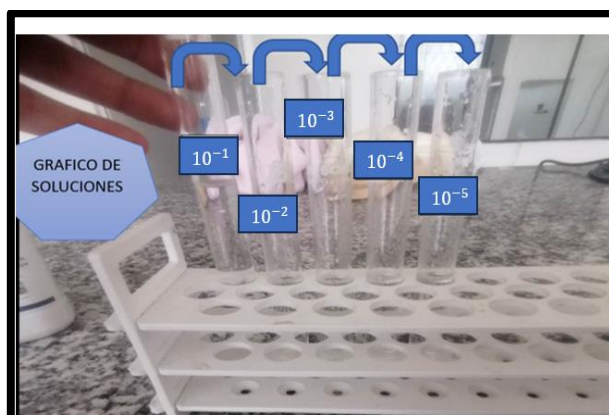
- b) Colocamos en 5 tubos de ensayo 9 ml de agua destilada y procedemos a tomar 1 ml de la muestra madre, vertemos la misma en el primer tubo de ensayo y hacemos este paso en forma consecutiva como se muestra en la imagen.

Figura 29: Disoluciones seriadas



Fuente : (Santos, 2022, p. 45).

Figura 30: Distribución de 1 ml de sustrato de forma seriada en 5 tubos de ensayo o 5 soluciones.



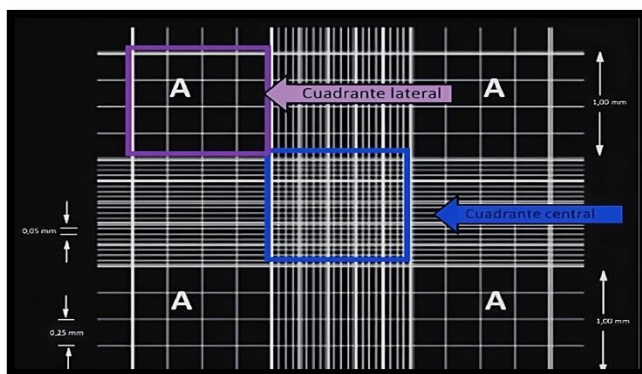
Elaborado por: Freire A.(2023)

- c) Se contaron conidias en cinco áreas de la cámara de Neubauer (cuatro en las esquinas y una en el medio). Se debe utilizar la siguiente fórmula para obtener el valor total de conidios observados.

$$46 \times 10.000 \times 10 \times 10 \times 10 = 4 \times 10^8$$

Fuente (santos,2022, p.34)

Figura 31: Cámara Neubabuer



Fuente : (santos,2022, p.34)

Figura 32: Observación de conidias en la solución -3 en la cámara de Neubauer a través del microscopio.



Elaborado por: Freire A.(2023)

23.1.2. Valor de conidias de *Metarhizium* spp por gramo de sustrato

Tabla 3: Número de conidias por gramo de sustrato

Soluciones	N° Conidias primer contero	N° Conidias segundo conteo (6 meses)
Tercera solución 10^3	$46 \times 10.000 \times 10 \times 10 \times 1 = 4 \times 10^8$	$19 \times 10.000 \times 10 \times 10 \times 10 = 2 \times 10^8$

Elaborado por: Freire A. (2023)

El sustrato se puede almacenar a temperatura ambiente durante uno o seis meses, sin que se pierda la viabilidad, no se debe exponer a la luz directa ni a la humedad. Según Granda (2006, pág. 30)

El almacenamiento por mayor a 6 meses se tiene que hacer en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C.

Las evaluaciones de rendimiento (conidias por gramo de polvo y viabilidad) se deben realizar al momento del secado y antes de 1 año de su almacenamiento (Granda, 2006, pág. 31).

A partir del conteo de conidias en el empaquetado se obtuvo un valor de 4×10^8 , en el segundo conteo se obtuvo un valor de 2×10^8 dando como resultado la comprobación de permanencia de conidias en el sustrato guardado 6 meses.

Según (Keller et al., 2003), puede producirse mediante un proceso de dos etapas utilizando medios sólidos de arroz, produciendo productos que contienen alto contenido de conidias en un tiempo más corto que el requerido por los métodos convencionales basados en materiales sólidos. Los resultados contribuirán a futuros métodos de producción y producción en masa de esta onda de radio.

Figura 33: Enfundado del producto final



Elaborado por: Freire A.(2023)

23.2. Elaboración y socialización de la Guía de propagación de *Metarhizium* spp.

Las pautas de laboratorio o procedimientos operativos estándar son un conjunto de instrucciones a seguir al realizar experimentos. Este es un plan para repetir resultados favorables de las pruebas. Los laboratorios de investigación requieren muchos protocolos de seguridad para operar equipos analíticos y desarrollar soluciones con errores mínimos. (Stanley 2014, pág. 1)

La guía de propagación debe ser enfocada en un tipo de ensayo. Para que el agricultor sepa el producto a obtener si sigue los pasos planteados, por ello cualquier terminología debe ser explicada para mejor comprensión del agricultor.

Figura 34: Socialización de aplicación del Sustrato con *Metarhizium* spp

Elaborado por: Freire A(2023)

Figura 35: Entrega de la guía de propagación.



Elaborado por: Freire A.(2023)

Figura 36: Entrega de las fundas de sustrato.



Elaborado por: Freire A.(2023)

24. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES, ECONÓMICOS).

Los impactos generados en los ámbitos técnicos, sociales, ambientales y económicos son los siguientes:

24.1. Impactos Técnicos

El desarrollo de este proyecto marca un impacto técnico en cuestión del proceso, de industrialización de producción de *Metarhizium* spp en sustrato vegetal.

24.2. 11.2 Impactos Sociales.

Tiene un impacto social positivo ya que beneficia a la gran parte de cañicultores para el control de plagas de su cultivo, y mejor acogida de los consumidores a productos libres de químicos y beneficiosos para su salud

24.3. Impactos Ambientales

Alternativas de bio insecticidas para el control de plaga en el cultivo de caña y conservación de los suelos agrícolas.

24.4. Impactos Económicos

Mejor rentabilidad económica para el agricultor en la compra de insecticidas orgánicos para el cultivo de caña.

25. CONCLUSIONES

- Se obtuvo 4×10^8 conidias de *Metarhizium spp* por gramo de sustrato donde se utilizó un medio sólido a base de arroz, teniendo como producto final una alta concentración de conidias.
- Se obtuvo una prevalencia de 2×10^8 conidias de *Metarhizium spp* por gramo de sustrato después de 6 meses de su almacenamiento.
- Se realizó una Guía mediante la cual se puede dar a conocer paso a paso de cómo se llevó a cabo la producción del *Metarhizium spp* a base del sustrato en arroz este protocolo puede dar lugar a que los estudiantes que quieran realizar nuevas investigaciones se basen en ya lo obtenido en el protocolo.

26. RECOMENDACIONES

- Realizar más investigaciones sobre el hongo *Metarhizium spp* para ver cómo el control de plagas puede ser beneficioso desde el punto de vista económico y ambiental
- Como alternativa al control biológico, investigar nuevos métodos de reproducción sobre diferentes sustratos de hongos entomopatógenos.
- Dar charlas de los resultados obtenidos en la Guía de propagación *Metarhizium spp*. en sustrato de arroz.

27. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

A. Hussein, K., H. A. Hassan, S., & Ho Joo, J. (2011). Potential capacity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* spp in the biosorption of Cd²⁺ and Pb²⁺. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(6), 347-355. <https://doi.org/10.2323/jgam.57.347>

Abawi, G. S., & Widmer, T. L. (2000). Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00070-6)

Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 76-81. <https://doi.org/10.7550/rmb.33649>

Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., Angel-Cuapio, A., Alcantara-Vargas, E., EspitiaLópez, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidias de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2912>

Amerasan, D., Nataraj, T., Murugan, K., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Nicoletti, M., & Benelli, G. (2016). Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium* spp against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae). *Journal of Pest Science*, 89(1), 249-256. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0675-x>

Anu Eskelinen. (2009). *Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats* | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00442-009-1362-5>

Ashraf, M., Farooq, M., Shakeel, M., Din, N., Hussain, S., Saeed, N., Shakeel, Q., & Rajput, N. A. (2017). Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone

and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and

Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Serna-Domínguez, M. G., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2015). Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10), 1192-1207.

<https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1041878>

Barajas, C. G., del Pozo, E. M., García, I., & Méndez, A. (2010). OBTENCIÓN DE CONIDIAS DEL AISLAMIENTO MA-002 DE *Metarhizium* spp (METSCH.) SOROKIN MEDIANTE UNA ALTERNATIVA DE CULTIVO BIFÁSICO. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 174-180.

Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B., & Ranjard, L. (2009). Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 262-275. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.024>

Bender, S. F., Wagg, C., & van der Heijden, M. G. A. (2016). An Underground Revolution: Biodiversity and

Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(6), 440-452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>

Benjamin, M. A., Zhioua, E., & Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and Field Evaluation of the

Entomopathogenic Fungus *Metarhizium* spp (Deuteromycetes) for Controlling Questing Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 723-728. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.5.723>

Boga, C., Vecchio, E., Forlani, L., & Franceschetti, M. (2014). Microbes to clean indoor pollutants. *Environmental Chemistry Letters*, *12*, 429-434.

<https://doi.org/10.1007/s10311-014-0465-3>

Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., & Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, *58*, 216-234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>

Butt, T. M., Ibrahim, L., Ball, B. V., & Clark, S. J. (1994). Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium* spp and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honeybee.

Biocontrol Science and Technology, *4*(2), 207-214.

<https://doi.org/10.1080/09583159409355328>

Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., Moral, R. de A., Demétrio, C. G. B., &

Delalibera, I. (2016). Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application.

Agriculture, Ecosystems & Environment, *233*, 361-369.

<https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.031>

Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J., & Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(4), 355-367.

<https://doi.org/10.1111/j.15746976.1994.tb00145.x>

Chávez, K. G. F., Navarro, S. R., Mayagoitia, J. F. C., & Florido, J. E. B. (2011). *Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas*. 18.

Chelvi, C. T., Thilagaraj, W. R., & Nalini, R. (2011). *Field efficacy of formulations of microbial insecticide Metarhizium anisopliae (Hyphocreales: Clavicipitaceae) for the control of sugarcane white grub Holotrichia serrata F (Coleoptera: Scarabidae)*. *Journal of Biopesticides*, 4.

Christine M Eisenhauer. (2010). *Deep Roots Support New Branches: The Impact of Dynamic, CrossGenerational Rural Culture on Older Women's Response to Formal Health Care | Online Journal of Rural Nursing and Health Care*.

<https://rnojournals.binghamton.edu/index.php/RNO/article/view/73>

Christopher B. Craft. (1997). *Relationships between Soil Nutrients and Plant Species Composition in Everglades Peatlands—Craft—1997—Journal of Environmental Quality—Wiley Online Library*.

<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq1997.00472425002600010032x>

Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2013). Horizontal Transmission of *Metarhizium anisopliae* in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. *Insects*, 4(2), 206-216. <https://doi.org/10.3390/insects4020206>

Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, 156(4), 375-382. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000003579.48647.16>

Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>

Edwards, C. A., & Thompson, A. R. (1973). Pesticides and the soil fauna. En F. A. Gunther & J. D. Gunther (Eds.), *Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other*

Contaminants in the Total Environment (pp. 1-79). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8493-3_1

Ferron, P. (1978). Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>

Fungaro, M. H. P., Vieira, M. L. C., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. de. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 389-392. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01186.x>

Geisseler, D., & Scow, K. M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>

Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S01677012\(99\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S01677012(99)00054-8)

Inglis, G. D., Duke, G. M., Goettel, M. S., & Kabaluk, J. T. (2008). Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(1), 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.12.001>

Jacoby, R., Peukert, M., Succors, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>

Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2008). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18(8), 849-863. <https://doi.org/10.1080/09583150802381144>

Jennifer B. Hughes Martiny. (2006). *Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map* *Nature Reviews Microbiology*.

<https://www.nature.com/articles/nrmicro1341>

John W. Doran. (2000). *Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality*—*ScienceDirect*.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139300000676>

Keller, S., Kessler, P., & Schweizer, C. (2003). Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, 48(3), 307-319. <https://doi.org/10.1023/A:1023646207455>

Kristiansen, J. E., Hendricks, O., Delvin, T., Butterworth, T. S., Aagaard, L., Christensen, J. B., Flores, V. C., & Keyzer, H. (2007). Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm071>

Lacey, L. A., Amaral, J. J., Coupland, J., Klein, M. G., & Simoes, A. M. (1995). Flight Activity of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) after Treatment with *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 5(2), 167-172.

<https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1020>

Levy, Y., & J. Ellis, T. (2006). A Systems Approach to Conduct an Effective Literature Review in Support of Information Systems Research. *Informing Science: The International Journal of an Emerging Transdiscipline*, 9, 181-212.

<https://doi.org/10.28945/479>

Luz, C., Tigano, M. S., Silva, I. G., Cordeiro, C. M., & Aljanabi, S. M. (1998). Selection of *Beauveria Bassian* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(6), 839-846.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000600026>

Madriz, L. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. https://www.academia.edu/24117171/MANUAL_DE_LABORATORIO_PARA_EL_MANEJO_DE_HONGOS_ENTOMOPAT%C3%93GENOS?from=cover_page

N. C. M. Gomes. (2001). *Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (Zea mays) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis* / SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010350406708>

N. Eisenhauer. (2010). *Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis— Eisenhauer—2010—Ecology—Wiley Online Library*. <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/08-2338.1>

Nayak, A. K., Gangwar, B., Shukla, A. K., Mazumdar, S. P., Kumar, A., Raja, R., Kumar, A., Kumar, V., Rai, P. K., & Mohan, U. (2012). Long-term effect of different integrated nutrient management on soil organic carbon and its fractions and sustainability of rice–wheat system in Indo Gangetic Plains of India. *Field Crops Research*, 127, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.11.011>

Nicholson, P. S., & Hirsch, P. R. (1998). The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 551-558. <https://doi.org/10.1046/j.13652672.1998.00381.x>

Noah Fierer & Robert B. Jackson. (2005). *The diversity and biogeography of soil bacterial communities* / PNAS. <https://www.pnas.org/content/103/3/626>

P. C. Brookes. (2006). *Detection and quantification of the soil microbial biomass – impacts on the management of agricultural soil*.

https://www.researchgate.net/publication/231781965_Detection_and_quantification_of_the_soil_microbial_biomass_-_impacts_on_the_management_of_agricultural_soil

P. Garbeva. (2004). *MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness* | *Annual Review of Phytopathology*. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>

Pablo Cuevas-Reyes. (2003). *Species richness of gall-forming insects in a tropical rain forest: Correlations with plant diversity and soil fertility* | *SpringerLink*. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022415907109>

Quesada-Béjar, V. (2020). Pathogenicity of *Metarhizium* spp. On *Sphenarium purpurascens* in Central Mexico. *Southwestern Entomologist*, 45(1), 57. <https://doi.org/10.3958/059.045.0106>

San Andrés, V., Ayala, I., Abad, M. C., Primo, J., Castañera, P., & Moya, P. (2014). Laboratory evaluation of the compatibility of a new attractant contaminant device containing *Metarhizium anisopliae* with *Ceratitis capitata* sterile males. *Biological Control*, 72, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.007>

Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (2012). *Methods in Soil Biology*. Springer Science & Business Media.

SciELO Ayuda. (s. f.). Recuperado 9 de febrero de 2020, de https://images.webofknowledge.com/WOKRS514B4/help/es_LA/SCIELO/hs_search_operators.html

Shah, F. A., Wang, C. S., & Butt, T. M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insectpathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>

Simu & Hagström. (2004). *Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis—Boström—2004—Limnology and Oceanography:*

Methods—Wiley Online Library.

<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lom.2004.2.365>

Singh, B. P., Cowie, A. L., & Chan, K. Y. (2011). *Soil Health and Climate Change*. Springer Science & Business Media.

Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: Uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas*, 13(3), Article 3. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/201>

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5: 240-245. *Current opinion in microbiology*, 5, 240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)

Tupe, S. G., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). Development of *Metarhizium anisopliae* as a

Mycoinsecticide: From Isolation to Field Performance. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 125, 55272. <https://doi.org/10.3791/55272>

Velázquez, A., Mas, J. F., Díaz-gallegos, J. R., Mayorga-Saucedo, R., Alcántara, P. C., Castro, R., Fernández, T., & Bocco, G. (2002). *Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México*. 18.

Zhang, X. C., Li, X. X., Gong, Y. W., Li, Y. R., Zhang, K. L., Huang, Y. H., & Zhang, F. (2018). Isolation, Identification, and Virulence of a New *Metarhizium anisopliae* Strain on the German Cockroach. *Journal of Economic Entomology*, 111(6), 2611-2616. <https://doi.org/10.1093/jee/toy280>

Zimmermann, G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(1), 36-40. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90034-9)

Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375-379.

<https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879-920.

Granda, D. (2006). *Producción y uso de hongos entomopatógenos*. CATIE, 1-63.

Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0949E/A0949E.PDF>

Aceves, M. (2008). *Producción masiva de Trichoderma harzianum en diferentes sustratos*.

Stanley, N. (28 de noviembre de 2014). ehowenespanol.com. Obtenido de http://www.ehowenespanol.com/definicion-del-protocolo-laboratorio- sobre_98264/

Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

