



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**  
**CARRERA DE AGRONOMÍA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

---

**“MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE *Beauveria spp.* EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO LATACUNGA 2023”**

---

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Ingeniero Agrónomo

**Autor:**

Martínez Tubon Christian Andres

**Tutora:**

Toapanta Gallegos Diana Elizabeth

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Agosto 2023**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Christian Andres Martínez Tubon con cédula de ciudadanía No. 1804390712, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Métodos de conservación de *Beauveria spp.* en condiciones de laboratorio Latacunga 2023”, siendo la Ingeniera Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Tutora del presente trabajo; y, absuelvo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus actores legales de posibles reclamos o acciones legales.

Asimismo, certifico que las opiniones, conocimientos, procedimientos y resultados vertidos en el presente proyecto de investigación, son de mi responsabilidad.

Latacunga, 18 de agosto del 2023



Christian Andres Martinez Tubon

Estudiante

C.C. 1804390712



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Docente Tutora

C.C. 1002749800

## 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 **MARTINEZ TUBON CHRISTIAN ANDRES**, identificado con cédula de ciudadanía **1804390712** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, 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.** - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomía, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Métodos de conservación de *Beauveria spp.*, en condiciones de laboratorio Latacunga 2023”, 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: Abril 2023 – Agosto 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de Mayo del 2023

Tutor: Ingeniera Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

Tema: “Métodos de conservación de *Beauveria spp.* en condiciones de laboratorio Latacunga 2023”

**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 establecè 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, **EL 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 **EL 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 **EL 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 **EL 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 **EL 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 18 días del mes de agosto del 2023.



Christian Andres Martínez Tubon

**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema

**LA CESIONARIA**

## AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE *BEAVERIA SPP.* EN CONDICIONES DE LABORATORIO LATACUNGA 2023”, de Martínez Tubon Christian Andres, de la carrera de Agronomía, considero que el trabajo investigativo es digno 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, 18 de agosto del 2023



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg

**DOCENTE TUTORA**

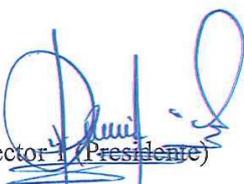
CC: 1002749800

## AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Proyecto 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, el postulante: Martínez Tubon Christian Andres, con el título del Proyecto de Investigación: "METODOS DE CONSERVACION DE BEAUVERIA SPP. EN CONDICIONES DE LABORATORIO LATACUNGA 2023", ha considerado las recomendaciones emitidas pertinentemente y reúne los méritos capaces para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 18 de agosto del 2023



Lector 1 (Presidente)

Ing. Francisco Hernan Chancusig, Mg.

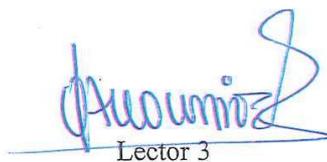
CC: 0501883920



Lector 2

Ing. Edwin M. Chancusig Espín, Ph.D.

CC: 0501148837



Lector 3

Ing. Wilman Paolo Chasi Vizuete, Mg.

CC: 0502409725

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo de investigación se lo agradezco en primer lugar a mi Dios que me dio la fuerza para no rendirme, a mis padres quienes con su día a día lucharon para lograr superarme en mis estudios, a mis hermanas que con sus consejos supieron alentarme para seguir de pie, y como no agradecer a mi tutora que con paciencia y perseverancia logramos nuestro objetivo, además a toda la planta docente de la universidad que cada ciclo fueron nutriendo de conocimientos nuestra mentalidad y desempeño.

Christian Andres Martínez Tubon

## **DEDICATORIA**

A mi familia que han sido mi soporte, compañía y alegría en los momentos más difíciles de mi vida. A los docentes que gracias a sus enseñanzas se cumplió esta etapa. A mí querida universidad que me acogió en todo este proceso.

Christian Andres Martínez Tubon

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TÍTULO: “METODOS DE CONSERVACION DE BEAUVERIA SPP. EN CONDICIONES DE LABORATORIO LATACUNGA 2023”.**

AUTOR: Martínez Tubon Christian Andres

**RESUMEN**

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo determinar un método que conserve las cepas de hongos entomopatógenos a largo plazo en condiciones de laboratorio, permitiendo mantener su viabilidad y producción conidial. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi como muestra de que se puede realizar este tipo de investigaciones en la institución. Discos de micelio con agar se almacenaron en tres métodos de conservación: aceite mineral (BbA), agua estéril (Bb), ultracongelación  $-70^{\circ}$  + solución de glicerol (BbG) y un testigo sin ninguna sustancia (BbT) por 30 días. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron pruebas de viabilidad mediante el crecimiento miceliar y producción de conidias. Para el crecimiento miceliar se determinó el diámetro de crecimiento al 8vo día desarrollo en caja petri, en este caso el método de agua destilada y el tratamiento testigo tuvieron una corta diferencia en el crecimiento siendo los únicos que obtuvieron resultados. Se empleó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones cuyas unidades experimentales constaban de 3 discos con micelio y agar del hongo *Beauveria spp.* el tratamiento control fue una cepa del hongo que no fue sometida a conservación, se observó cambios significativos en el método del aceite mineral ya que el 50% de las muestras no lograron conservarse, por otro lado el método de ultracongelación  $-70^{\circ}$  los discos se desprendían y la sustancia de conservación (glicerol) se impregnaba en el disco evitando que se propague el hongo. El método de conservación más efectivo fue el de agua estéril ya que logro obtener un crecimiento de micelio de 7,4 cm de diámetro comparado con el tratamiento control. De igual manera el método de conservación agua estéril presento una concentración de conidias de  $1,3 \times 10^6$  comparado con el tratamiento control con un valor de  $1,08 \times 10^6$ . Los aislamientos con los métodos de aceite mineral y ultracongelación a  $-70^{\circ}$ , no lograron desarrollar crecimiento micelial o producción de conidias. La selección de métodos de conservación facilita el desarrollo de protocolos efectivos para que cada hongo entomopatógeno pueda asegurar su pureza, estabilidad, crecimiento y viabilidad.

**Palabras clave:** cepas, método, estéril, entomopatógeno, glicerol, conidios.

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**  
**FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES**

**THEME: “CONSERVATION METHODS OF BEAVERIA SPP. UNDER LABORATORY CONDITIONS LATACUNGA 2023”**

AUTHOR: Martínez Tubon Christian Andres

**ABSTRACT**

The objective of this research project is to determine a method that preserves entomopathogenic fungal strains in the long term under laboratory conditions, allowing to maintain their viability and conidial production. The research was carried out in the microbiology laboratory of the Technical University of Cotopaxi as a sign that this type of research can be carried out in the institution. Mycelium discs with agar were stored in three conservation methods: mineral oil (BbA), sterile water (Bb), deep freezing  $-70^{\circ}$ + glycerol solution (BbG) and a control without any substance (BbT) for 30 days. Once the time elapsed, viability tests were carried out through mycelial growth and conidia production. For mycelial growth, the growth diameter was determined on the 8th day of development in a petri dish, in this case the distilled water method and the control treatment had a short difference in growth, being the only ones that obtained results. A completely randomized design was used with 3 repetitions whose experimental units consisted of 3 disks with mycelium and agar of the *Beauveria* spp. fungus. the control treatment was a strain of the fungus that was not subjected to conservation, significant changes were observed in the mineral oil method since 50% of the samples could not be preserved, on the other hand the  $-70^{\circ}$  deep-freezing method, the discs were they detached and the preservative substance (glycerol) was impregnated in the disc preventing the spread of the fungus. The most effective conservation method was sterile water since it managed to obtain a growth of mycelium of 7.4 cm in diameter compared to the control treatment. In the same way, the sterile water conservation method presented a concentration of conidia of  $1.3 \times 10^6$  compared to the control treatment with a value of  $1.08 \times 10^6$ . The isolates with the mineral oil and deep-freezing methods at  $-70^{\circ}$  failed to develop mycelial growth or conidia production. The selection of conservation methods facilitates the development of effective protocols so that each entomopathogenic fungus can ensure its purity, stability, growth and viability.

**Keywords:** strains, method, sterile, entomopathogenic, glycerol, conidia

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	3
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	4
4 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	5
4.1 Beneficiarios directos.....	5
4.2 Beneficiarios indirectos.....	5
5 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	5
6 OBJETIVOS .....	6
6.1 Objetivo General.....	6
6.2 Objetivos Específicos.....	6
7 ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	7
8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	9
8.1 LOS BIOCONTROLADORES .....	9
8.2 BIOINSUMOS.....	9
8.3 BEAUVERIA SPP.....	10

8.3.1 Taxonomía .....	11
8.3.2 Morfología general .....	11
8.3.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	12
8.3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE .....	13
8.3.5 PRINCIPALES INSECTOS CONTROLADOR DE BEAUVERIA SPP. ....	14
8.4 ALMACENAMIENTO .....	14
8.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS .....	14
8.5 CULTIVOS PUROS .....	15
8.6 METODOS DE CONSERVACION .....	16
8.6.1 Conservación en silica gel .....	16
8.6.2 Conservación en aceite mineral .....	16
8.6.3 Conservación en agua destilada .....	16
8.6.4 Crioconservación en Ultracongelación a (-20°C)-(-196°C) .....	17
8.6.5 Ventajas Y Desventajas de los Métodos De Conservación .....	17
9. Metodología .....	19
9.1 Ubicación del Área de estudio .....	19
9.2 Modalidad de investigación .....	19
9.2.1 De laboratorio .....	19
9.3 Tipo de investigación .....	20
9.3.1 Diseño de investigación Descriptiva .....	20
9.4 Fase de laboratorio .....	20
9.4.1 Materiales, equipos y reactivos .....	20
9.4.2 Reactivación de cepas .....	21
9.4.3 Cultivos puros .....	22
9.4.4 Incubación del cultivo .....	22
9.4.5 Aplicación de métodos de conservación .....	22
Agua destilada estéril .....	22

Aceite mineral.....	23
Ultracongelación -70° .....	23
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
10.1 Crecimiento micelial .....	25
Análisis estadístico (viabilidad).....	26
10.2 Producción conidial.....	28
11 CONCLUSIONES .....	30
12 RECOMENDACIONES .....	30
13 BIBLIOGRAFIA .....	31
14 ANEXOS .....	1

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Taxonomía de <i>Beauveria spp.</i> .....	11
Tabla 2	Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria spp.</i> .....	12
Tabla 1	Ventajas y desventajas método de conservación en aceite mineral .....	17
Tabla 2	Ventajas y desventajas método de conservación en agua destilada .....	18
<b>Tabla 3</b>	Ventajas y desventajas método de conservación ultracongelacion.....	18
Tabla 4	Cepas en conservación de agua destilada luego de 30 días .....	23
Tabla 5	Cepas en conservación de aceite mineral luego de 30 días .....	24
Tabla 6	Cepas en conservación ultracongelacion a -70° luego de 30 días.....	24
Tabla 7	Crecimiento micelial final evaluando 5 tratamientos con método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo(sin tratamiento).....	26
Tabla 8	ADEVA crecimiento final de <i>Beauveria spp.</i> evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo. ....	26
Tabla 9	Pruebas tukey del crecimiento final de <i>Beauveria spp.</i> evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo. ....	27
Tabla 10	Conteo realizado en cámara de neuvauer y aplicado la fórmula.....	28
Tabla 11	<b>ADEVA</b> de la producción conidial, evaluando el tratamiento de agua destilada y el tratamiento testigo.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Acción de <i>Beauveria spp.</i> .....	11
Figura 2	Estructura macroscópica de <i>beauveria spp.</i> .....	12
Figura 3	Características microscópicas de <i>beauveria spp.</i> .....	12
Figura 4	Imágenes microscópicas del hongo <i>B. bassiana</i> .....	14
Figura 5	Campus CEASA UTC.....	19
Figura 6	Figura la figura muestra la forma correcta para recoger la muestra de una caja Petri evitando contaminación.....	22
Figura 7	Grafica crecimiento final de <i>Beauveria spp.</i> evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.....	27
Figura 8	Grafica Producción conidial (conidias/ml) de <i>Beauveria spp.</i> evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.....	29

## 1. INFORMACIÓN GENERAL

**Título del Proyecto:**

“METODOS DE CONSERVACION DE *Beauveria spp.* EN CONDICIONES DE LABORATORIO LATACUNGA 2023.”

**” Fecha de inicio:**

Abril 2023

**Fecha de finalización:**

Agosto 2023

**Lugar de ejecución:**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**Facultad que auspicia:**

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.

**Carrera que auspicia:**

Ingeniería Agronómica.

**Proyecto de investigación vinculado:**

**Equipo de Trabajo:**

Responsable del Proyecto: Christian Andres Martínez Tubon Tutor: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos

Lector 1: Ing. Francisco Hernan Chancusig Mg.

Lector 2: Ing. Edwin M. Chancusig Espín, Ph.D.

Lector 3: Ing. Paolo Chasi Vizuete Mg.

**Coordinador del Proyecto:**

Nombre: Christian Andres Martínez Tubon Teléfonos: 0979056361

Correo electrónico: [christian.martinez0712@utc.edu.ec](mailto:christian.martinez0712@utc.edu.ec)

**Área de Conocimiento:**

Agricultura - Agricultura, silvicultura y pesca - producción agropecuaria

**1.1 Línea de investigación:****1.2 Línea 1:****a. Desarrollo y Seguridad Alimentaria**

La seguridad alimentaria es la disponibilidad de los alimentos necesarios para una vida saludable. El propósito de la línea es mejorar el acceso de la comunidad a alimentos nutritivos e inoos e investigar productos, factores y procesos que mejoren las economías locales. Esto es parte de esta línea ya que se pretende eliminar la inocencia de plagas en los alimentos para su correcta exportación.

**Sub líneas de investigación de la Carrera:**

- a. Caracterización de la biodiversidad
- b. Bio conocimiento como alternativa a la producción agrícola

**1.3. Línea de vinculación**

Gestión de recursos naturales, biodiversidad, biotecnología y genética para el desarrollo humano social

## **2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

La presente investigación se realiza con el fin de encontrar métodos para conservar hongos entomopatógenos en este caso *beauveria spp.* como una alternativa eficaz y económica que sea buena con el medio ambiente, reduciendo la contaminación por controladores químicos, esta investigación va de la mano con la colaboración del laboratorio en el Campus CEEASA-UTC. Se recurrió al re aislamiento de hongos base que posee la universidad para obtener resultados confiables con los métodos que se va a proponer en esta investigación la cual permitirá maneja de mejor manera las cepas conservadas ya que la investigación generara a futuro un beneficio al sector productivo y el ecosistema en general.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Varios de los aislamientos de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN, han perdido su pureza y viabilidad, debido a su metodología de conservación, esto evita su accesibilidad a futuras investigaciones. Es necesario optar por métodos de conservación que permitan obtener una colección confiable de hongos entomopatógenos que a partir de reaislamientos garantice la autenticidad, virulencia y pureza de los mismos, de esta manera generar un recurso viable (SENPLADES, 2013).

El uso de materias primas agrícolas de base biológica permite la producción de alimentos limpios en línea con las demandas del mercado. Los insumos agrícolas con mayor demanda son los agentes de biocontrol, especialmente para el control de plagas (OCDE/FAO, 2013). En el suelo existe una amplia variedad de hongos entomopatógenos que tienen un gran potencial como agentes de control biológico de insectos y otras plagas (Pucheta, Flores, Rodríguez & Torre, 2006). El uso de estos hongos como biocontroladores forma parte de un programa integral de manejo de plagas y representa una alternativa viable para que los agricultores protejan la salud y el medio ambiente (Cañedo & Ames, 2004).

El término “hongos entomopatógenos” se refiere a microorganismos que pueden atacar insectos (Devotto et al., 2000) o que son medidas de control para reducir las poblaciones de insectos que transmiten enfermedades que dañan los cultivos (Scholte et al., 2004; Tanzini et al., 2001). También se definen como parásitos obligados o facultativos de insectos con alta capacidad de esporulación y supervivencia. Sus mayores ventajas son su manejo y adaptación a diferentes ambientes, su especificidad y su capacidad para atravesar directamente la piel (Allendes, 2007). El desarrollo y la aplicación de la entomopatología comenzaron en 1879 con el estudio de Hagen sobre el uso potencial de los hongos para controlar insectos. Uno de los géneros más importantes dentro del grupo de hongos entomopatógenos es *Beauveria* (Rehner et al. & Buckley, 2005).

Los aislamientos en el laboratorio de microbiología de la facultad CAREN se encuentran almacenados en cajas Petri a 4°C. para trabajar en las distintas investigaciones con los distintos aislamientos es necesario realizar varios reaislamientos.

## **4 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

### **4.1 Beneficiarios directos**

Pequeños y medianos productores que buscan alternativas para reducir costos de producción y contaminación con su salud y el medio ambiente, estudiantes de la Universidad Técnica de Cotopaxi que den seguimiento a la investigación.

### **4.2 Beneficiarios indirectos**

Agricultores a nivel nacional, laboratorios que se especialicen en la producción a pequeña escala de microorganismos.

## **5 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La conservación de microorganismos es fundamental en los laboratorios que manejan colecciones de cultivos microbianos; las principales características que deben conservarse son la pureza, la viabilidad y la estabilidad genética (Rico *et al.*2004). Además, si un determinado cultivo fúngico resulta ser de particular importancia, debe almacenarse para futuras investigaciones en una colección de microorganismos (Smith and Onions, 1994, Smith, 2012). Tales colecciones sirven como bancos de recursos naturales, que deberían estar accesibles y disponibles para futuras investigaciones (Hawksworth y Mound, 1991, Hawksworth y Colwell, 1992). Esto lleva a analizar que método se podría operar en los laboratorios en base a las ventajas y desventajas que muestra cada uno y de igual forma al equipo con el que cuenta el laboratorio, es por eso que se elige más de un método para realizar las adecuadas pruebas en hongos de interés y con esto reducir la posibilidad de que todos los cultivos pierdan su viabilidad.

La mayoría de las enfermedades de las plantas suelen controlarse mediante la aplicación de fungicidas químicos al suelo, las semillas, las hojas y los frutos. Los efectos negativos sobre la salud, la contaminación ambiental y el desarrollo de resistencias están impulsando la búsqueda de alternativas al uso de agentes biológicos. El control biológico utiliza organismos. Esto también incluye microorganismos que reducen el daño causado por patógenos de plantas debido a su actividad biológica. Este antagonismo permite reducir o eliminar los brotes de patógenos vegetales. Un agente de control biológico eficaz debe tener la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente, independientemente de su actividad en el hábitat donde es aplicado. (Noboa Guerra & Quelal Guerrero , 2015)

El desarrollo de productos a base de hongos entomopatógenos implica determinar el grado de interacción entre el hongo, su huésped y el ambiente, la concentración del producto y el método de formulación adecuado para permitir que estos organismos se coloquen en condiciones de campo. Desempeña un papel en la capacidad de regular mejor las plagas en los agroecosistemas (Motta & Murcia, 2011).

El propósito de la preservación es mantener viables las esporas del verificador biológico, evitar la eliminación frecuente y evitar la pérdida de virulencia. Hay dos principios de conservación: Disminuir el metabolismo: Estos incluyen el almacenamiento en frío, el uso de aceite mineral y agua estéril, etc. y la Inducción de la dormancia. (Ayala , y otros, 2017)

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Evaluar 3 métodos de conservación de *Beauveria spp.* en condiciones de laboratorio.

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Reaislar aislamientos de *Beauveria spp.* almacenados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de CAREN.
- Establecer el mejor método de conservación de *Beauveria spp.* bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar la viabilidad de *Beauveria spp.* luego de 30 días en los 3 diferentes métodos de conservación.

## 7 ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

OBJETIVO 1	ACTIVIDADES	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD	MEDIO DE VERIFICACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> <li>Reislar aislamientos de <i>Beauveria spp.</i> almacenados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de CAREN.</li> </ul>	<p>Se realizó aislamientos de <i>Beauveria spp.</i> conservados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN.</p> <p>Reislamiento del hongo <i>Beauveria spp.</i> para obtener cepas viables.</p> <p>Obtención de cultivos monospóricos</p>	<p>Reislamientos</p> <p>Purificación del cultivo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Guía de laboratorio para la reactivación de aislamientos.</li> <li>Fotos</li> <li>Tablas</li> </ul>
OBJETIVO 2	ACTIVIDADES	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD	MEDIO DE VERIFICACIÓN
<ul style="list-style-type: none"> <li>Establecer el mejor método de conservación de <i>Beauveria spp.</i> bajo condiciones de laboratorio</li> </ul>	<p>Los reislamientos de <i>Beauveria spp.</i> fueron conservados en 3 métodos: agua destilada estéril, aceite mineral y la ultracongelacion a -70°C.</p>	<p>Aislamientos almacenados en incubadora a 27°C; en refrigerador a 4°C; y en congelador a -70°C</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fotos</li> <li>Investigación presentada</li> </ul>

<b>OBJETIVO 3</b>	<b>ACTIVIDADES</b>	<b>RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD</b>	<b>MEDIO DE VERIFICACIÓN</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar la viabilidad de <i>Beauveria spp.</i> luego de 30 días en los 3 diferentes métodos de conservación</li> </ul>	<p>Determinar el crecimiento micelial luego de la reactivación de cada uno de los métodos.</p> <p>Produccion conidial para cada uno de los métodos a los 30 días</p>	<p>Determinar el crecimiento micelial a los 30 días.</p> <p>Produccion conidial (conidias/ml) a los 30 días</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis Crecimiento micelial y producción de conidias/ml</li> </ul>

## **8. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **8.1 LOS BIOCONTROLADORES**

El aumento de la productividad agrícola debe lograrse mediante el uso de tecnologías sostenibles que nos permitan satisfacer la creciente demanda de alimentos y las exigencias del mercado en cuanto a calidad e inocuidad. (Sumpsi, 2012) propone cuatro tecnologías sostenibles económica y ambientalmente. Agricultura de conservación basada en labranza mínima o cero de la tierra, y siembra de cultivos asociados o intercalados; la agricultura de precisión; el Manejo integrado de plagas y enfermedades que combina el uso de variedades de cultivos resistentes con el uso juicioso de pesticidas. Conservación y uso sostenible de la biodiversidad a través de la biotecnología, especialmente la mejora genética (p. 5-6).

Con respecto a las propuestas de biotecnología, la idoneidad de utilizar modificaciones genéticas aún es controvertida debido a la hipótesis de que las modificaciones genéticas tienen efectos adversos en la salud humana y el medio ambiente, ya que como es fértil, es decir, las semillas son estériles, el costo de producción también es controversial. - Las semillas germinadas y nuevas deben comprarse a empresas multinacionales (Morales Estupiñán, 2001). El manejo integrado de plagas (MIP) se considera la opción más viable ya que el objetivo es mantener cultivos saludables con un impacto ambiental mínimo (Duarte, 2012). El biocontrol representa una estrategia biotecnológica ambientalmente limpia compatible con la agricultura ecológica y el MIP (Monte & Llobell, 2003). Su objetivo es "crear un equilibrio entre las plagas y los biocontroladores para que las plagas alcancen niveles en los que ya no sean dañinas". El control biológico es el método convencional de control de plagas más conveniente porque es económico, no induce resistencia en las plagas, no representa un riesgo para la salud humana y es amigable con el medio ambiente.

### **8.2 BIOINSUMOS**

Han surgido en respuesta a la demanda mundial de alimentos orgánicos trazables y seguros. Estos son productos elaborados a partir de microorganismos (hongos, actinomicetos, bacterias) que promueven el crecimiento de las plantas ya sea directamente al promover la absorción de nutrientes por parte de las plantas o indirectamente al ayudar a controlar enfermedades y plagas (Murillo et al., 2010). ; Nora Artia, Elena Beyhout, 2012). Por tanto, pueden clasificarse como biofertilizantes y biocontroladores, aunque una misma cepa

microbiana puede tener ambas funciones (Altier, Beyhaut, Rizza & Rivas, 2012). Este es el caso del género *Trichoderma*. No solo parasitan hongos fitopatógenos, sino que también inducen el crecimiento de las plantas y mejoran las respuestas inmunitarias locales y sistémicas (Dou et al., 2014; Elliot et al., 2000; J.F. White et al., 2014). al., 2002). .

Los microorganismos con potencial de biocontrol deben ser cepas de rápido crecimiento con abundante formación de esporas, alta virulencia para las plagas y bajos costos de producción. Además, las preparaciones microbianas deben tener una vida útil prolongada (aproximadamente 18 meses) en condiciones ambientales sin perder significativamente su infectividad (Couch & Ignoffo, 1981).

### **8.3 BEAVERIA SPP.**

El hongo fue descrito por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis badsiana*. Vuillemann luego lo puso en su clase actual. Las pruebas enzimáticas posteriores confirmaron que el género era *Beauveria* spp. Se distinguieron seis especies: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. brongniart*, *B. velata*, *B. caledónica* (Kouassi, 2001, pp. 2-3).

“*Beauveria bassiana* es un saprofito facultativo que quitiniza células y parasita insectos en virtud de su mecanismo físico y químico de infección” (Echeverría, 2006, p. 13). "Este hongo causa una enfermedad mortal de los insectos llamada muscardina blanca, que les da a los insectos afectados una apariencia momificada” (Lecuona, 2007, pág. 15).

*Beauveria spp.* es un hongo que infecta a los insectos a través de los conidios (órganos reproductores asexuales). Los conidios se adhieren a la epidermis del huésped, donde se desarrolla el tracto reproductivo y penetra en la cavidad sanguínea. Esta invasión es posible gracias a las enzimas secretadas que permiten la degradación de las proteínas, la quitina y los lípidos de la piel de los insectos (Ferron, Fargues, Riba, 1991; Khachatourians, 1991). Una vez dentro del huésped, el hongo se multiplica y libera blastosporas como se muestra en la Figura 1. Este insecto muere por deficiencia nutricional de hemolinfa y/o toxicidad causada por micotoxinas fúngicas (Khachatourians, 1991; Roberts, 1981). Sin embargo, los efectos antifúngicos sobre los insectos objetivo no siempre son letales. Los efectos subletales o secundarios informados en la literatura incluyen disminución de la fertilidad y fecundidad de los hongos y de la fecundidad de las esporas (Feng, 1994).

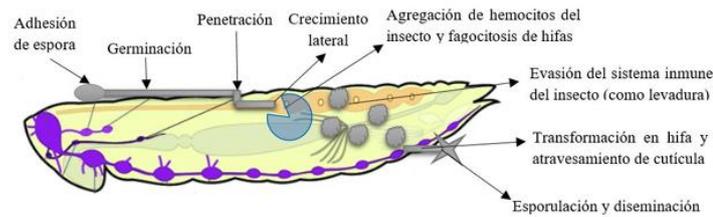


Figura 1 Acción de *Beauveria spp.*

Fuente: (Carballo, Rodriguez, & Duran , 2001)

### 8.3.1 Taxonomía

Tabla 1 Taxonomía de *Beauveria spp.*

Reino:	<i>Fungí</i>
Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hipocreales</i>
Familia:	<i>Clacicipitaceae</i>
Género:	<i>Beauveria</i>
Especie:	<i>Beauveria Bassiana</i>

Fuente: (Gongora Botero, Marin Marin, & Benavides Machado , 2013)

### 8.3.2 Morfología general

#### ➤ Características macroscópicas

"Al principio crece como una pelusa blanda, pero luego tiene un aspecto amarillento, y después de unos días se vuelve una crema polvorienta debido a las esporas. El dorso es blanco o amarillo pálido". (Ortiz, 2009, pág. 15).

#### ➤ Características microscópicas

"*Beauveria bassiana* es un hongo imperfecto, que posee una hifa septal que contiene estructuras reproductivas llamadas conidióforos en las que se desarrollan los conidios" (Hernández & Berlanga, 1999, p. 1).

Los conidios son células simples haploides, hidrofóbicas, globulares y ovoides, de color opalescente, con estigmas alargados en zigzag alternados en sus extremos distales llamados lats. En cultivo sólido, el hongo produce conidios esféricos (1 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro) u ovalados (1,5 a 5,5 x 1 a 3  $\mu\text{m}$ ). Las blastosporas no son tan contagiosas como las conidias (Ortiz, 2009, pág. 16).



Figura 2 Estructura macroscópica de *beauveria* spp.

Fuente: (Carballo, Rodríguez, & Duran , 2001)



Figura 3 Características microscópicas de *beauveria* spp.

Fuente: (Martínez, 2023)

### 8.3.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Tabla 2 Condiciones de crecimiento de *Beauveria* spp.

<b>Factor</b>	<b>Descripción</b>
pH	Crecimiento entre 5,7 – 5,9
Temperatura	Crecimiento entre 25 – 30°C (mínimo de 10°C y máximo de 30°C)
Humedad	Alrededor del 94%

Necesidades Nutricionales	Sacarosa, fuentes de carbono (glucosa, almidón, pectina) y nitrógeno (peptona)..
---------------------------	--

Fuente: (Merino Peñafiel, 2017)

### 8.3.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Los métodos tradicionales de identificación de especies relacionan las características macroscópicas (morfología, color, etc.) de las colonias de hongos y las características microscópicas (tamaño, forma, color, etc.) de las esporas con las claves taxonómicas reportadas, basadas en la observación. Literatura (Medo & Cagán, 2011).

Los micelios en etapa asexual de especies de *Beauveria*. Es de color blanco con una parte inferior amarillenta, tiene una textura algodonosa a polvorienta y se caracteriza por conidióforos simples agrupados irregularmente o en verticilos. En algunas especies, los conidióforos tienen forma de botella (Ramos Delgado, 2016). Morfológicamente, *Beauveria* tiene hifas hialinas septales, de 2.5 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, de las cuales se aíslan conidióforos simples agrupados con poca frecuencia, con conidios y sincitiales o apicales, como se muestra en la figura. Las esporas son hialinas y esféricas, pero cuando se reduce la concentración de oxígeno en el medio se vuelven ovaladas y se denominan esporas (Barron, 2001).

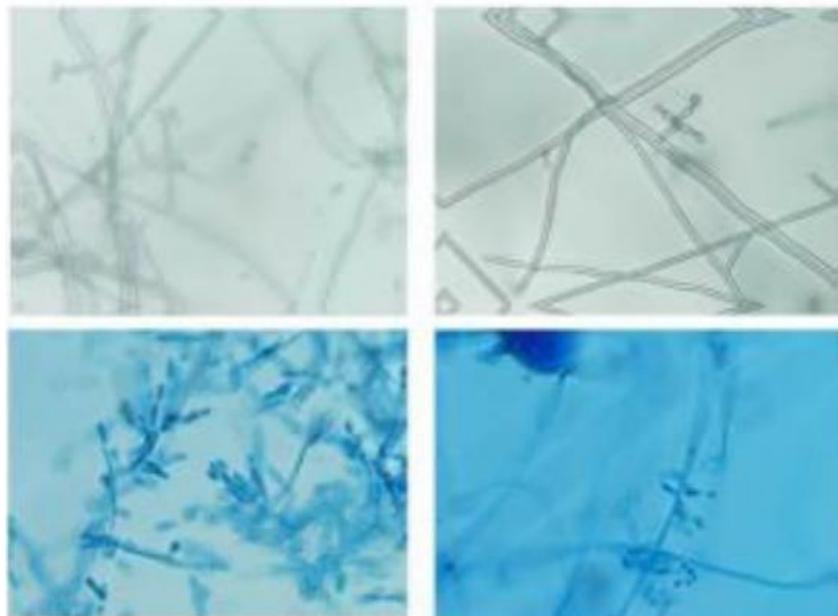


Figura 4 Imágenes microscópicas del hongo *B. bassiana*

Fuente: (Barron, 2001).

### **8.3.5 PRINCIPALES INSECTOS CONTROLADOR DE BEAUVERIA SPP.**

En la agricultura, este hongo es utilizado por el escarabajo colorado de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), la broca del café (*Hypothenemus hampei*), termitas y hormigas (*Acromyrmex* sp, *Atta* sp), la broca europea del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y la broca del pino. oruga (*Dendrolimus* spp), grillo verde (*Nephotettix* spp) y polilla (*Laspeyresia pomonella*), entre otros.

### **8.4 ALMACENAMIENTO**

Los productos formulados se pueden almacenar en condiciones ambientales durante uno o dos meses sin perder viabilidad, dijo Granda, siempre que no estén expuestos a la luz solar directa o la humedad. Para el almacenamiento a largo plazo, debe refrigerarse a una temperatura de aproximadamente 4 °C.

### **8.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS**

Para las cepas de rutina, el almacenamiento en medios sólidos generalmente se realiza a 24°C en la oscuridad. Sin embargo, la viabilidad comienza a disminuir después de 1 semana de almacenamiento. Para mantener la cepa viable, se debe subcultivar cada 6 semanas, almacenar a 4 °C y analizar la infectividad cada 6 meses (M.C. Rombach, Aguda & Roberts, 1988; Wagner & Lewis, 2000). Las esporas liofilizadas se pueden almacenar a 20 °C (Ying & Feng, 2004). Por otro lado, el agua de esporas o las soluciones de glicerol al 10% pueden almacenarse a -80 °C (Kim, Kassa, Skinner, Hata & Parker, 2011). . ). Prado et al., 2016. Posada y Vega, 2005).

Las soluciones que contienen glicerol también se pueden complementar con 0,05 % de Tween 80 (Pham, Kim, Kim & Kim, 2009), fructosa, glucosa o sacarosa para actuar como crioconservadores ya que este hongo es sensible al frío (Toegel et al., 2010). . ). Taylor y Feng (1994) mostraron una viabilidad del 93,3% de las conidias en agua a 4°C. 87,3% y 35,3% para periodos de retención de 8, 12 y 19 meses respectivamente. Por otro lado, las

tasas de supervivencia de las blastosporas sumergidas bajo las mismas condiciones de almacenamiento son 32,0, 29,3 y 4,8%, respectivamente. Las esporas también se pueden almacenar a temperatura ambiente en un contenedor de atmósfera controlada. Las atmósferas que contienen CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> o He pueden mantener hasta un 51 % de viabilidad a 50 °C. En cambio, en una atmósfera de 20% CO<sub>2</sub> y 80% N<sub>2</sub>, la viabilidad de las esporas se puede mantener hasta un 80% durante 150 días a 40 °C, o hasta un 80% durante 30 días a 50 °C y hasta 87 % durante 16 semanas a 25 °C. Siempre que la actividad del agua (AW) sea de 0,032 o menos (Faria, Hotchkiss & Wraight, 2012). Un método para determinar la viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos es utilizar suspensiones de hongos estandarizados de concentraciones definidas dispersas en placas que contienen agar Sabouraud o agar patata dextrosa. Las placas se incuban a 24-26°C, fotoperiodo de 12 horas y 60-80% de humedad relativa. Después de 24 horas, se cuantificó el porcentaje de conidios germinados y no germinados por microscopía de luz (S.B. Alves, 1998). Oliveira, Pauli, Mascarin y Delalibera (2015) desarrollaron un protocolo más específico.

## **8.5 CULTIVOS PUROS**

Un cultivo puro es el desarrollo de un organismo sin la proliferación de otros organismos. Se obtiene aislando el hongo del cultivo o inóculo original. El inóculo se siembra o se coloca en una placa de Petri que contiene medio de cultivo PDA (u otro medio). Se llama puro porque contiene solo las bacterias deseadas (sin impurezas). En el proceso de producción de hongos, la obtención de un cultivo puro es el paso más importante ya que es el inóculo para iniciar el proceso de producción y se utiliza para inocular el sustrato. A la hora de obtener un cultivo puro para incluirlo en el proceso de producción, es necesario asegurarse de que el aislado sea fresco y posea todas las características de la cepa, especialmente las relacionadas con su vigor y virulencia. Para mantener estas propiedades, el hongo debe reactivarse al menos dos veces al año.

La reactivación fúngica se realiza mediante bioensayo y consiste en inocular con el hongo a los insectos de la especie que controla el hongo. Por ejemplo, si es la cepa utilizada para el control de la broca del café, se debe recolectar este insecto para realizar el bioensayo. Después de la inoculación, continúe la incubación y coloque el bioensayo en condiciones de temperatura apropiadas. Los bioensayos deben revisarse diariamente y los insectos muertos deben retirarse y colocarse en una habitación húmeda para estimular la esporulación de

hongos. Finalmente, aísle los hongos de los insectos esporulantes utilizando técnicas apropiadas.

## **8.6 METODOS DE CONSERVACION**

El propósito de la conservación es mantener viables las esporas del verificador biológico, evitar la eliminación frecuente y evitar la pérdida de virulencia. Hay dos principios de conservación:

- a) La reducción del metabolismo: Esto incluye almacenamiento en frío, uso de aceite mineral, agua estéril, suelo estéril, etc.
- b) Inducción de la dormancia: incluido el secado sobre gel de sílice, uso de nitrógeno líquido liofilizado (mantenimiento de las temperaturas a temperaturas criogénicas, es decir, bajo cero). La liofilización y la criogenia requieren equipos especiales y consumibles costosos (Cadeño & Ames, 2004, p. 45).

### **8.6.1 Conservación en sílica gel**

El método de conservación sobre gel de sílice consiste en extraer la fase líquida de la estructura. En otras palabras, la deshidratación ralentiza el metabolismo. Después de la esterilización con calor seco del gel de sílice, es importante mantenerlo sellado para evitar la exposición al aire debido a la naturaleza higroscópica del soporte utilizado. Es un método seguro y fácil de recuperar el microorganismo con todas sus propiedades (Cadeño & Ames, 2004, p. 47).

### **8.6.2 Conservación en aceite mineral**

En este método, los cultivos en condiciones óptimas para el crecimiento del micelio y la esporulación se recubren con aceite mineral estéril. Generalmente se utiliza aceite mineral de alta calidad. Esta práctica reduce el secado del sustrato, ralentiza la actividad metabólica del cultivo, reduce la tensión de oxígeno y reduce el potencial de infestación de ácaros (Alarcón, 2006, pp. 20-25).

### **8.6.3 Conservación en agua destilada**

El almacenamiento de hongos entomopatógenos en agua destilada estéril o el método Castellani ha demostrado ser una técnica que garantiza un alto porcentaje de viabilidad de las

cepas, pureza y estabilidad fenotípica, además de económica y sencilla, por lo que constituye una alternativa favorable. Se utiliza en laboratorios con recursos limitados, pero también en grandes colecciones de países desarrollados. (Fernandez C. , Diaz , Illnait, & Martinez , 2013).

A pesar de los avances acelerados en la conservación de microorganismos, la conservación en agua destilada estéril sigue gozando de una posición privilegiada como método económico, sencillo y seguro que puede garantizar la viabilidad a largo plazo de los cultivos fúngicos (Malik y Hoffmann 1993). . Este método es especialmente útil para organismos que no se pueden liofilizar, como: *B. Entomophthora* (López Lastra et al. 2002), u hongos que no toleran la congelación profunda.

#### **8.6.4 Crioconservación en Ultracongelación a (-20°C)-(-196°C)**

En la crioconservación, los materiales biológicos se estabilizan a temperaturas criogénicas que oscilan entre -20 °C y -196 °C. Este es un método bien conocido y ampliamente utilizado en la actualidad. El principio es que las células, tejidos y organismos expuestos a bajas temperaturas permanecen inactivos, es decir, a bajas temperaturas, perjudicando sus funciones vitales y se suprime su actividad metabólica (Pasarellt y McGinnis, 1992; Rico et al., 2004). ).

Hay muchos factores que pueden afectar la viabilidad y la estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, incluida la edad de las células, la velocidad de congelación y descongelación, la temperatura de almacenamiento y el uso de crioprotectores. Este último es un compuesto con una alta afinidad por el agua. Tales sustancias previenen el daño que puede ocurrir durante la congelación de células microbianas. Los crioprotectores más utilizados incluyen glicerol, dimetilsulfóxido, leche desnatada, inositol, sacarosa, glucosa y lactosa (García y Uruburu, 2001; Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005)

La congelación es el proceso ha sido un fenómeno complejo durante décadas. El estado de la investigación aún está en curso y no siempre se comprende completamente. La investigación en criobiología nos ha permitido especular qué sucede cuando las células vivas se congelan y cómo superan los fenómenos no deseados. (Montesinos , Ayala , & Berlanga , 2015)

#### **8.6.5 Ventajas Y Desventajas de los Métodos De Conservación**

Tabla 1 Ventajas y desventajas método de conservación en aceite mineral

VENTAJAS	DESVANTAJAS
----------	-------------

<p>Económico y técnicamente simple, se recomienda para laboratorios con recursos limitados.</p> <p>Algunos hongos, especialmente aquellos susceptibles a otros métodos de conservación, persisten por largos períodos de tiempo.</p>	<p>Los almacenamientos deben mantenerse en posición vertical, por lo que se debe considerar el espacio disponible.</p>
--	--

**Fuente:** (Montesinos , Ayala , & Berlanga , 2015)

Tabla 2 Ventajas y desventajas método de conservación en agua destilada

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<p>Es económico, técnicamente simple y no requiere equipo especial.</p> <p>Ahorro de espacio (botella pequeña)</p> <p>Recomendado para la conservación a medio plazo de microorganismos.</p>	<p>El nivel de agua requerido debe verificarse continuamente.</p> <p>Algunos hongos pierden viabilidad después de un corto período de tiempo.</p>

**Fuente:** (Montesinos , Ayala , & Berlanga , 2015)

Tabla 3 Ventajas y desventajas método de conservación ultracongelacion

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<p>El equipo tradicional está disponible en algunos laboratorios.</p> <p>Almacenamiento a largo plazo sin nitrógeno líquido.</p> <p>Adecuado para la mayoría de los hongos.</p>	<p>Un descenso gradual de la temperatura también puede provocar la formación de cristales de hielo.</p> <p>Pérdida de reserva debido a interrupción.</p>

**Fuente:** (Montesinos , Ayala , & Berlanga , 2015)

## 9. Metodología

### 9.1 Ubicación del Área de estudio

El trabajo de investigación en la Universidad Técnica de Cotopaxi Campus CEASA Cantón Latacunga.



Figura 5 Campus CEASA UTC

Fuente: google maps

### 9.2 Modalidad de investigación

#### 9.2.1 De laboratorio

En el presente trabajo de investigación se indago métodos de conservación de hongos entomopatogenos en este caso *Beauveria* spp. que ayuden a reactivar y mejorar las condiciones de las cepas almacenadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN campus CEASA-UTC. Y brinden beneficios tanto en conservación como en producción libres de contaminantes y optando como opción el control biológico por medio de dichas cepas.

Dado que el máximo objetivo es el control, se realiza en un ambiente controlado (de tipo laboratorio) pues carece de las características propias del ambiente natural. Para lo cual se crea un ambiente óptimo que permita realizar de manera correcta la investigación.

### **9.3 Tipo de investigación**

#### **9.3.1 Diseño de investigación Descriptiva**

El diseño de investigación descriptivo es un método científico que consiste en observar, analizar y describir el comportamiento de los sujetos sin influir en ellos de ninguna manera. (Silva & Alejandro, 2019)

### **9.4 Fase de laboratorio**

El desarrollo de la investigación se realizó con muestras almacenadas en Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN.

#### **9.4.1 Materiales, equipos y reactivos**

a) Material biológico

Cepas almacenadas de *Beauveria spp.* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN.

b) Material de laboratorio

- Cajas Petri
- Estuche de disección
- Aza metálica
- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Marcador
- Papel aluminio
- Papel de cocina
- Cinta Parafilm
- Plástico film
- Tubos de ensayo

- Tubos eppendorf

c) Reactivos

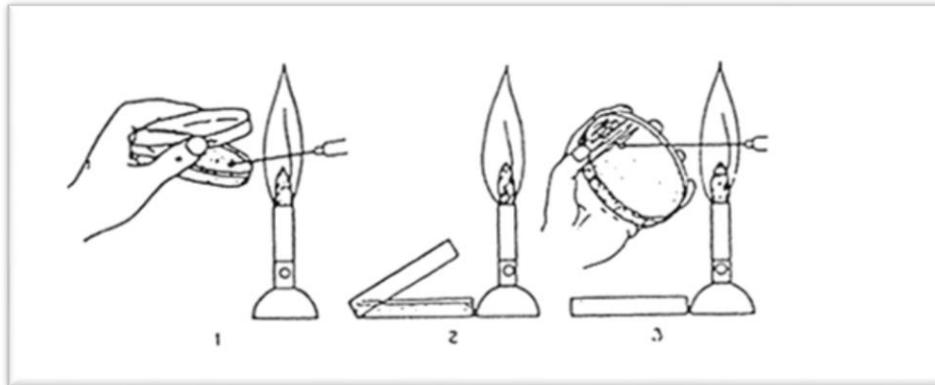
- PDA(agar papa dextrosa)
- Aceite vegetal
- Agua destilada
- Glicerol
- Ácido láctico
- Antibióticos (gentamax)

#### **9.4.2 Reactivación de cepas**

El laboratorio de la carrera de agronomía cuenta con cepas de varios hongos entomopatógenos que pasan en refrigeración de las cuales por medio de microscopios observaremos la adecuada esporulación en cuanto al hongo requerido *Beauveria spp.* que presten las condiciones para una correcta reactivación.

De las cepas refrigeradas, se seleccionaron varios aislamientos recolectados en la Costa y Sierra Ecuatoriana, a simple vista se trabajó con cepas de la costa pero no se obtuvieron buenos resultados, y es por este motivo que la cepa de la sierra ya observada bajo microscopio era la mejor para poder trabajar en la reactivación. De cada caja Petri con las cepas de *Beauveria spp.* se toma un trozo con el bisturí de no más de 2mlx2ml. Estas cepas se sometieron a medio de cultivo PDA+5ul de ácido láctico en 10 cajas Petri (esto debido a que la primera práctica se contaminó y es por eso que se utiliza dicho ácido). Se etiquetan las cajas con el nombre, la fecha y el medio trabajado, almacenándolas en incubación durante 7 días a 27°C.

Figura 6 Figura la figura muestra la forma correcta para recoger la muestra de una caja Petri evitando contaminación.



Fuente: (Monzon, 2021)

### 9.4.3 Cultivos puros

Este tipo de cultivos se los obtiene de la reactivación de cepas anteriormente especificadas, la razón de estos cultivos puros es para trabajar con cepas libres de contaminación y con una esporulación correcta, de igual manera evitando trabajar con cepas caducas o muertas or su tiempo de almacenamiento.

### 9.4.4 Incubación del cultivo

La incubación es el período durante el cual ocurre el crecimiento y reproducción del hongo. Después de realizar la inoculación, los platos petri se colocan en los lugares de crecimiento a temperatura de 24 a 28 o C, durante un tiempo de 4 a 6 días. Durante este periodo se observa el crecimiento del micelio y la producción de conidias. Normalmente esta etapa finaliza cuando el hongo llega a cubrir toda la superficie del medio de cultivo en el plato petri. Para realizar limpieza de los contaminantes y darle seguimiento al cultivo, se deben realizar observaciones cada 48 horas. (Montesinos , Ayala , & Berlanga , 2015)

### 9.4.5 Aplicación de métodos de conservación

#### Agua destilada estéril

Para lo cual tomaremos 100ml de agua destilada para posteriormente autoclavarla a 120°C en 45min, este proceso lo realizamos dos veces similar a la metodología de (Ayala, 2017), el

agua destilada ya esterilizada la llevaremos a la cámara de flujo laminar para posteriormente trabajar con las cepas reactivadas de *beauveria* spp..

### **Aceite mineral**

Este método se lo debe realizar con suma precaución ya que el aceite se lo va a esterilizar en estufa alternando un poco la teoría de (Ayala, 2017) que menciona que se debe esterilizar a 120°C en 15 minutos para después de 24 horas volver a ese proceso pero a 180°C, en esta investigación se lo realiza en estufa a 100°C la primera esterilización por 25 min para dentro de 24 horas volver a la estufa y en 100°C a 25 minuto repetir el proceso, tomamos esta opción en base a que el equipo con el que contamos no presta la temperatura sugerida..

### **Ultracongelación -70°**

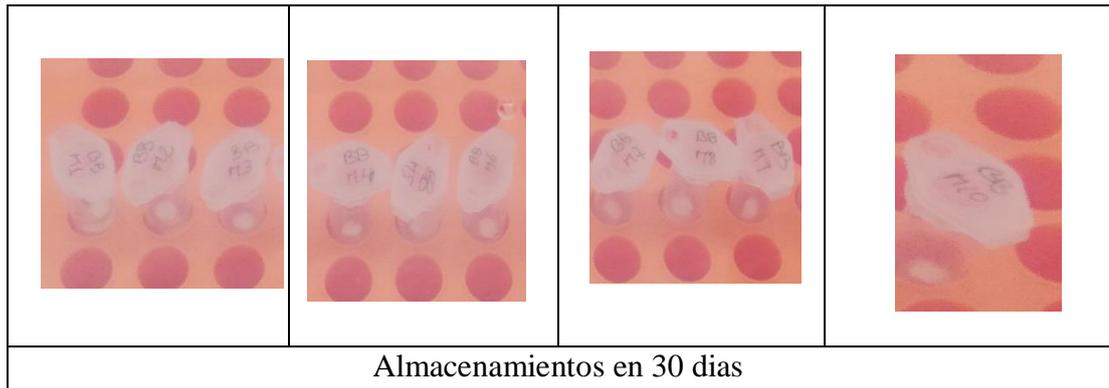
Los criotubos se llenan con 1,3ml de glicerol estéril (10% v/v); autoclavado a 120°C por 15min. Luego se colocó un disco de 5mm de la superficie de cultivo del hongo. Tres discos de micelio fueron colocados en cada vial, dejándolos completamente inmersos en glicerol. Los criotubos permanecen 12 horas a 4°C para luego ser almacenado a -70°C.

## **10.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Por medio de los cultivos monospóricos se obtienen cultivos puros viables para realizar los aislamientos con un adecuado desarrollo, para de esta manera lograr trabajar en los métodos de conservación que preservara las condiciones de *Beauveria spp.* Los resultados se conocerán de acuerdo a la viabilidad que presentara cada método de conservación. Los controles de viabilidad se realizaron a los 30 días.. Se va a considerar el crecimiento micelial y la producción de conidias.

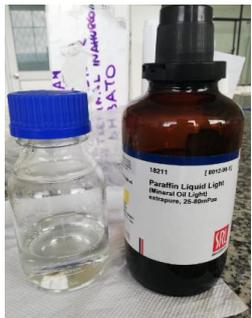
Tabla 4 Cepas en conservación de agua destilada luego de 30 días

<b>Conservación en Agua Destilada Autoclavada</b>			
<i>Almacenamientos</i>			
BbM1-BbM3	BbM4-BbM6	BbM7-BbM9	BbM10



Fuente; (Martínez, 2023)

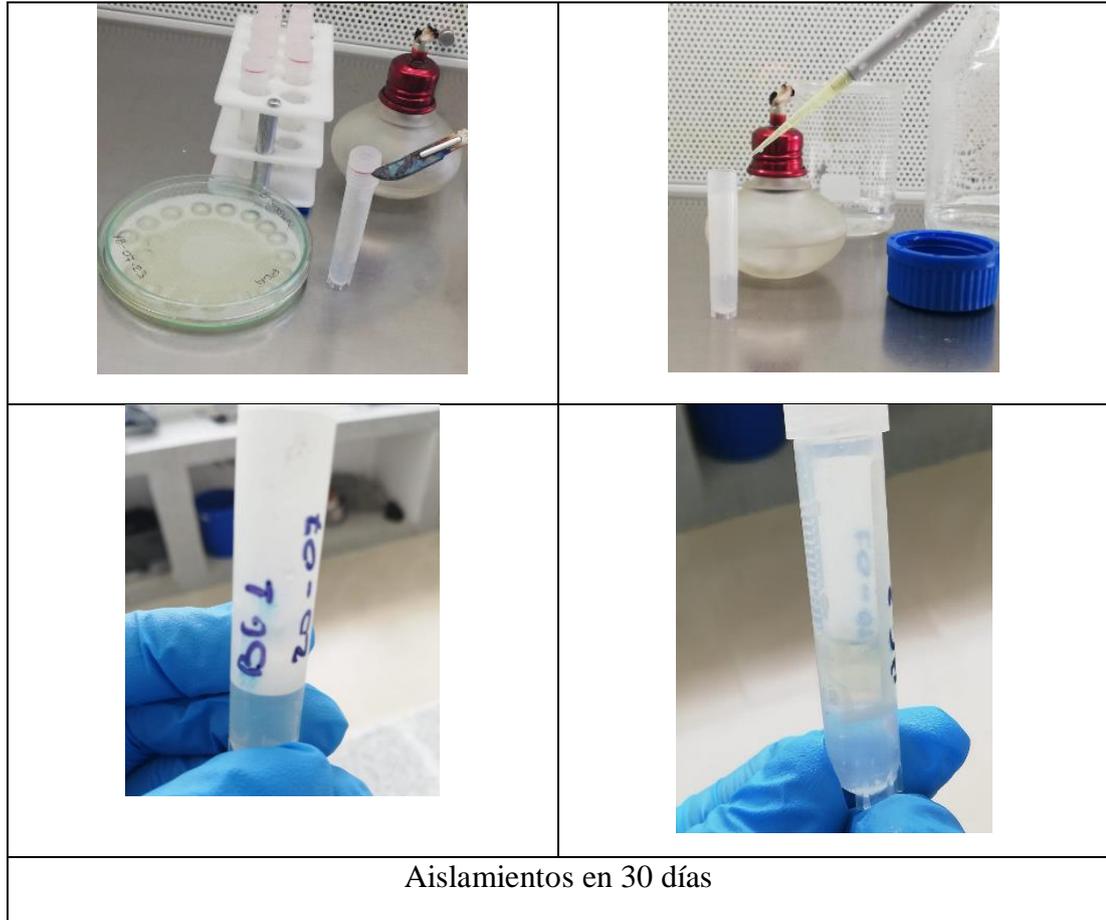
Tabla 5 Cepas en conservación de aceite mineral luego de 30 días

<b>Conservación en Aceite Mineral</b>			
<i>Aislamientos</i>			
BbA1-BbA5		BbA6-BbA10	
			
Aislamientos en 30 días			

Fuente; (Martínez, 2023)

Tabla 6 Cepas en conservación ultracongelacion a -70° luego de 30 días

<b>Conservación ultracongelación</b>	
<i>Aislamientos</i>	
BbG1-BbG5	BbG6-BbG10



### 10.1 Crecimiento micelial

- Agua destilada (Bb)

Después de 30 días de conservación este método mantuvo la viabilidad de los 5 tratamientos aislados y probados, mostrando un crecimiento desde su primer día almacenado a 27°C en caja Petri obteniendo un crecimiento final luego de 8 días de 7,2 cm de diámetro, este dato se considerara para su análisis estadístico como indica la referencia de (Torres Gutierrez , Valle Ramirez, Caicedo Quinche , Abril Saltos, & Sucoshañay Villalba, 2020), los datos del desarrollo se los tomo con un calibrador.

- Aceite Mineral (BbA)

Luego de 30 días de conservación el método presenta un rendimiento de viabilidad del 25% de los aislamientos probados, es decir de los 5 tratamientos solamente funcionaron 3, lo cual no es un dato justificable para realizar un análisis y el método es descartado.

- Ultracongelacion -70° (BbG)

Posterior a los 30 días este método de crioconservación no obtuvo resultados, a simple vista se manifiesta una represión del hongo y esto podría deberse al glicerol sustancia que se ocupó para su aislamiento. De igual manera este método fue descartado para el análisis posterior.

- Testigo (BbT)

Al cabo de 30 días el tratamiento testigo muestra una viabilidad en sus 5 aislamientos, mostrando un crecimiento micelial final luego de 8 días de 7,44 cm de diámetro. El desarrollo micelial se lo midió con un calibrador.

Fuente: (Martínez, 2023)

### **Análisis estadístico (viabilidad)**

El análisis estadístico del crecimiento micelial y la producción conidial con el método de conservación agua destilada estéril y el tratamiento testigo. Como factor presenta, tratamientos método de conservación agua destilada y un tratamiento testigo, con 5 repeticiones, que manifieste la variable del crecimiento micelial final del hongo *Beauveria spp.* y que muestre una hipótesis que permitirá considerar el aislamiento de las cepas.

Tabla 7 Crecimiento micelial final evaluando 5 tratamientos con método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo(sin tratamiento)

Tratamientos	OBSERVACIONES					Suma	Promedio
	I	II	III	IV	V		
Bb	6,53	6,73	7,07	7,20	6,67	34,2	11,40
BbT	7	8	7	7,8	7,4	37,2	12,40
Total						71,4	23,80

Fuente: (Martínez, 2023)

Tabla 8 ADEVA crecimiento final de *Beauveria spp.* evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
R	10,00	0,44	0,37	5,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,9	1	0,9	6,25	0,0369
Tratamiento	0,9	1	0,9	6,25	0,0369
Error	1,15	8	0,14		

Total	2,05	9
-------	------	---

Fuente: (Martínez, 2023)

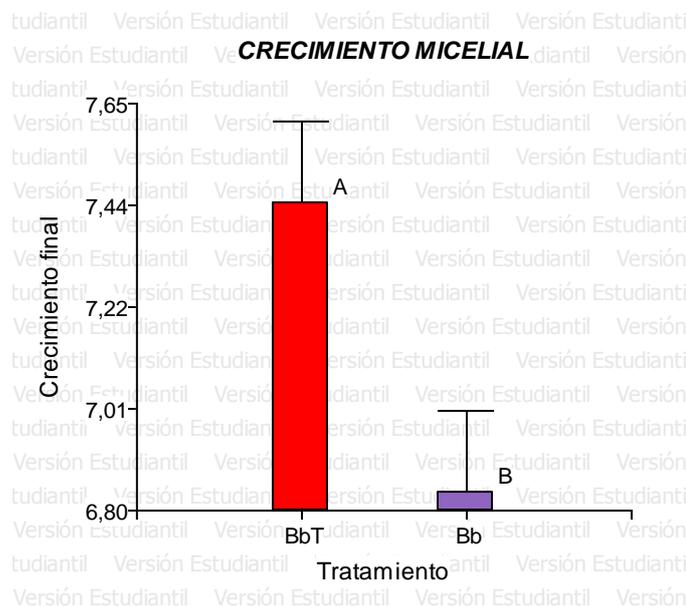
**Discusión:** Existen diferencias significativas entre el tratamiento Bb (conservación en agua destilada) y el tratamiento testigo, el valor p (0,0369) con un coeficiente de variación de 5,3 que demuestra la hipótesis alternativa en donde se hace referencia a que el tratamiento control es quien domina en tanto al desarrollo del hongo

Tabla 9 Pruebas tukey del crecimiento final de *Beauveria spp.* evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55334				
Error: 0,1440 gl: 8				
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
BbT	7,44	5	0,17	A
Bb	6,84	5	0,17	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )				

Fuente: (Martínez, 2023)

Figura 7 Grafica crecimiento final de *Beauveria spp.* evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.



Fuente: (Martínez, 2023)

**Discusión:** La prueba de significancia muestra que el tratamiento que domina es el control con un total de 7,44cm de diámetro de crecimiento frente a 6,84cm del tratamiento método de agua destilada. Por lo que deducimos que el aislado BbT (testigo) presenta diferencias significativas en relación al método de conservación agua destilada estéril, a pesar de su

diferencia, se verifica que el método de conservación agua destilada es viable corroborado por la investigación (Torres Gutierrez , Valle Ramirez, Caicedo Quinche , Abril Saltos, & Sucoshañay Villalba, 2020).

## 10.2 Producción conidial

Para determinar la concentración de conidios se probó en el método agua destilada y el tratamiento control ya que estos fueron los únicos que dieron buenos resultados. Se reactivó los conidios de la superficie de las cajas Petri de 8 días en incubadora a 27°C, para lo cual se raspo con bisturí el micelio de cada tratamiento para realizar una suspensión de conidios en 25ml de agua destilada estéril en vasos de precipitación, luego con la micropipeta se tomó 1ml del borde del vaso en tubos eppendorf evitando recolectar trozos de micelio a esa suspensión de conidios se le añadió 4ul de azul de metileno para posteriormente agitarlo por 2min en un Vórtex. Casi similar a la metodología de (Ladino Rey, Rubio, & Chacin Zambrano, 2016) que para su reactivación, se inoculo en papa dextrosa agar (PDA) y cultivar a 30 °C durante 10 días. Luego se removió el micelio con asa micológica y se transfirió a una suspensión, luego de 4 meses de almacenamiento en estudio, se ajustó la turbidez a grado 5 de McFarland, correspondiente a 1.5x10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, por triplicado.

El conteo de conidios se realizó en la cámara de Neubauer, revisando un total de 25 cuadrantes con ayuda del microscopio. La concentración de conidios por ml para cada tratamiento y el control, se estimó mediante la fórmula:

$$\text{Bb} \quad \text{concentracion de conidos} = \frac{\text{total de celulas contadas} \times 250000}{\text{numero de cuadros}} = 1100000 = 1,1 \times 10^6$$

BbT

$$\text{concentracion de conidos} = \frac{\text{total de celulas contadas} \times 250000}{\text{numero de cuadros}} = 1080000 = 1,08 \times 10^6$$

Tabla 10 Conteo realizado en cámara de neuvauer y aplicado la fórmula

Datos del conteo en cámara Neubauer		
Tratamiento	Conteo	Formula
BbT	108	1,08x10 <sup>6</sup>
Bb6	130	1,3x10 <sup>6</sup>
Bb7	95	0,95x10 <sup>6</sup>

Bb8	110	1,1x10 <sup>6</sup>
Bb9	100	1x10 <sup>6</sup>
Bb10	115	1,15x10 <sup>6</sup>

Fuente: (Martínez, 2023)

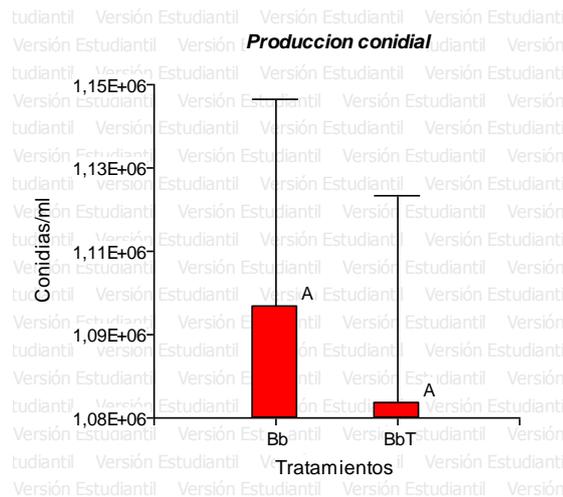
Tabla 11 ADEVA de la producción conidial, evaluando el tratamiento de agua destilada y el tratamiento testigo.

F d V	Gl	GL	SC	CM	F	P
Total	n-1	9	7,6x10 <sup>10</sup>			
Tratamientos	t-1	1	1x10 <sup>10</sup>	1x10 <sup>9</sup>	0,11	0,7524
E. exp		8	7,5x10 <sup>10</sup>	9,375x10 <sup>9</sup>		

CV%=	8,88
PROMEDIO	1090000

El análisis de varianza muestra un p valor de 0,7524 indicando que no existen diferencias significativas entre el tratamiento Bb (método de agua destilada estéril) y el testigo, con un coeficiente de variación de 8,8 que demuestra que el tratamiento agua destilada estéril tiene una diferencia mínima en la concentración de conidias/ml con el testigo.

Figura 8 Grafica Producción conidial (conidias/ml) de *Beauveria spp.* evaluando 5 tratamientos del método de conservación agua destilada y el tratamiento testigo.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05) Fuente:

(Martínez, 2023)

**Discusión:** La prueba de significancia muestra que tenemos una concentración de conidias/ml para el tratamiento del método de conservación agua destilada de  $1,1 \times 10^6$  conidias/ml y el testigo con  $1,08 \times 10^6$  conidias/ml esto muestra que no es significativa ( $p=0,75$ ) la diferencia entre ambos casos. Por lo que deducimos que el método de conservación agua destilada estéril es una opción viable a aplicar en *Beauveria spp.*

## 11 CONCLUSIONES

- Se logró reactivar aislamientos de *Beauveria spp.* almacenados a 4°C en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de CAREN.
- Luego de 30 días el método de conservación agua destilada obtuvo los mejores resultados en producción conidial con  $1,1 \times 10^6$  concentración de conidias/ml en relación al testigo  $1,08 \times 10^6$  conidias/ml, por otro lado en crecimiento micelial domina el testigo con 7,44 cm de diámetro a los 8 días de incubación y el método de conservación agua destilada estéril con un crecimiento micelial de 6,84cm de diámetro, a diferencia de los otros dos métodos de conservación que no obtuvieron resultados.
- El método de conservación agua destilada estéril (Castellani) es la mejor elección para aislamientos en laboratorios de recursos limitados y capaz de garantizar la viabilidad a largo plazo de *Beauveria spp.*

## 12 RECOMENDACIONES

- Se pueda realizar esta investigación a un periodo alargado ya que desarrollara mejor concentración de conidias y optar por aislamientos en laboratorio que beneficien las mismas.
- El método de conservación de agua destilada estéril es el más recomendable para que las cepas almacenadas en laboratorio logren mantener su estructura y así no pierdan su virulencia para utilizarlas en distintas investigaciones.
- Al conservar los aislamientos a largo plazo, estos quedaran disponibles para investigaciones a futuro.
- La forma como actualmente se conservan los aislamientos en laboratorio no permite utilizarlos, es por eso optar por un método de conservación como el manifestado en esta investigación (agua destilada estéril), afirmando que es una técnica sencilla económica y viable.

### 13 BLIBLIOGRAFIA

#### Bibliografía

- Ayala , M., Adrien , G., Berlanga-Padilla , A., Andrade Michel, G., Rodriguez Rodriguez , J., Aredondon Bernal, H., & Montesinos Masias, R. (Noviembre de 2017). *Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods.* Obtenido de Fungal Biology: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.007>
- Ayala Zermeño, M. A. (Julio de 2017). *MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.* Obtenido de Sagarpa: DOI: 10.13140/RG.2.2.25980.74885
- Bahamon, T., Aycardi , E., Orozco , J., Marin , P., & Bustillo , A. (2001). *Preservation of beauveria bassiana (balsam) vuillemin (moniliales: moniliaceae) pathogenicity against the coffee borer in different systems.* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/40905>
- Bermeo Escobar , L., & Castro Rios, K. (2020). *METHODS FOR THE CULTURE CONSERVATION OF EDIBLE AND MEDICINAL FUNGI.* Obtenido de JMBFS published article: [file:///C:/Users/Pao/Downloads/officejmbfs,+jmbfs\\_2497\\_escobar.pdf](file:///C:/Users/Pao/Downloads/officejmbfs,+jmbfs_2497_escobar.pdf)
- Cadeño, V., & Ames, T. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS.* Obtenido de Centro Internacional de la Papa (CIP): <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Carballo, M., Rodriguez, L., & Duran , J. (2001). *Evaluación de Beauveria bassiana para el control del picudo del chile en laboratorio.* Obtenido de CATIEC: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6257>
- Duarte Quintero, A. (2023). *Enseñanza del control biológico en huertas familiares de Bogotá mediante el uso de Beauveria bassiana y la mosca blanca (Bemisia tabaci) en cultivos de cebolla (Allium cepa).* Obtenido de Universidad Pedagógica Nacional: <http://hdl.handle.net/20.500.12209/18463>
- Fernandez , C., Diaz , L., Illnait, M. T., & Aragonés , C. (2012). *Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus.* Obtenido de Revista Scielo: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602012000100007&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602012000100007&script=sci_arttext&tlng=pt)

- Fernandez , C., Diaz , L., Illnait, M., & Martinez , G. (2013). Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 361-369. Obtenido de Revista Cubana de Medicina Tropical.
- Gato Cardenas , J. (Septiembre de 2010). *MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y FORMULACIÓN DE TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI*. Obtenido de Revista Scielo: <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v14n3/fit08310.pdf>
- Gerónimo Torres , J., Torres de la Cru, M., Perez de la Cruz, M., De la Cru Perez, A., & Ortiz Garcia, C. (Junio de 2016). *Caracterización de aislamientos nativos de Beauveria bassiana y su patogenicidad hacia Hypothenemus hampei, en Tabasco, México*. Obtenido de Revista Colombiana de Entomología: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v42n1/v42n1a06.pdf>
- Godinez, S., & Calderon , M. (2004). *Conservación de los hongos filamentosos en agua destilada*. Obtenido de Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=833457>
- Gómez Ramirez , H., Zapata Granja , A., Torres del Aguila , E., & Tenorio Cantoral, M. (2014). *MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS*. Obtenido de SENASA-PERU: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%83%C2%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%83%C2%B3genos.pdf>
- Gongora Botero, C., Marin Marin, P., & Benavides Machado , P. (2013). *Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café*. Obtenido de Repositorio digital del Centro Nacional de Investigaciones del Café - CENICAFE : <http://hdl.handle.net/10778/346>
- Gonzalez , C., Albretch Encina, M., Bich, G., & Castrillo, M. L. (Septiembre de 2021). *Aislamiento, identificación y conservación de cepas entomopatógenas del género Beauveria de yerbales orgánicos del Paraguay*. Obtenido de Impacto Revista de Ciencia y Tecnología: <https://revistas.uni.edu.py/index.php/impacto/article/view/344>
- Gonzalez Villaseñor, C., Alvarado Chavez , R., & Zepeda Jazo , I. (2015). *DISTRIBUCIÓN NATURAL DEL HONGO Beauveria bassiana (BALS.) VUIL. EN SUELOS AGRÍCOLAS Y NO CULTIVADOS DE LA CIÉNEGA EN MICHOACÁN*. Obtenido de Revista Entomología Mexicana: <https://www.researchgate.net/profile/Christian->

Gonzalez-

Villasenor/publication/362931963\_DISTRIBUCION\_NATURAL\_DEL\_HONGO\_Beauveria\_bassiana\_BALS\_VUIL\_EN\_SUELOS\_AGRICOLAS\_Y\_NO\_CULTIVADOS\_DE\_LA\_CIENEGA\_EN\_MICHOACAN/links/6307d20e61e4553b9539e10b/DISTRIBUCION

Hernandez Gonzalez, M., Hernandez Centeno, F., Lopez de la Peña, H., Flores Velastegui, M., & Sanchez Maldonado, M. (Julio de 2017). *MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN AGUAMIEL DE MAGUEY (Agave atrovirens Karw)*. Obtenido de Revista CiBlyT: [https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Hernandez-Centeno/publication/340209572\\_ALTERNATIVE\\_METHOD\\_FOR\\_THE\\_IDENTIFICATION\\_OF\\_AMINO\\_ACIDS\\_IN\\_MAGUEY\\_MEAD\\_Agave\\_atrovirens\\_Karw\\_in\\_spanish/links/5e7d07de299bf1a91b7eeba6/ALTERNATIVE-METHOD-FOR-THE-IDENT](https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Hernandez-Centeno/publication/340209572_ALTERNATIVE_METHOD_FOR_THE_IDENTIFICATION_OF_AMINO_ACIDS_IN_MAGUEY_MEAD_Agave_atrovirens_Karw_in_spanish/links/5e7d07de299bf1a91b7eeba6/ALTERNATIVE-METHOD-FOR-THE-IDENT)

Ibarra, A. M., & Varela, A. (2002). *Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas*. Obtenido de Revista Colombiana de Entomología: <https://revistacolombianaentomologia.univalle.edu.co/index.php/SOCOLEN/article/download/9637/12173>

Ladino Rey, O. E., Rubio, J. D., & Chacin Zambrano, C. A. (Junio de 2016). *Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite*. Obtenido de Centro Agrícola: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852016000200005&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852016000200005&script=sci_arttext&tlng=pt)

Linde, G. A., Luciani, A., Lopes, A. D., Do Valle, J. S., & Barros Colauto, N. (2018). *Criopreservación a largo plazo de basidiomicetos*. Obtenido de Brazilian journal of Microbiology: 10.1016/j.bjm.2017.08.004

Mafla, A., Peña Villamil, L., & Bacca Ibarra, T. (2004). *Evaluación de la actividad biocontroladora de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae sobre larvas de Ancognatha scarabaeiodes (Coleoptera: Scarabaeidae)*. Obtenido de revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria: <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449953025006.pdf>

- Merino Peñafiel, C. (2017). *Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin y Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga*. Obtenido de Universidad Nacional Mayor de San Marcos:  
[https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/6483/Merino\\_pc.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/6483/Merino_pc.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Molina Galloso, E., Andrade Hoyos , P., Garcia Espinosa , R., & Sosa Hernandez, C. (Noviembre de 2016). *Capacidad de sobrevivencia de tres especies de Phytophthora y dos de Pythium preservados en dos sustratos a corto y largo plazo*. Obtenido de Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas:  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000701759&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000701759&script=sci_arttext)
- Montesinos , R., Ayala , M. A., & Berlanga , M. (2015). *Manual para la Conservación y Mantenimiento de Hongos Entomopatógenos*. Obtenido de Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA):  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/210348/Manual\\_CMHE\\_-\\_10112015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/210348/Manual_CMHE_-_10112015.pdf)
- Montesinos Matias, R., Ayala Zermeño , M., Berlanga Padilla , A., & Arredondo , H. (Noviembre de 2014). *EFFECTO DE LA CRIOCONSERVACIÓN EN DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS*. Obtenido de INIFAP:  
[https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Ayala-Zermeno/publication/288670224\\_Efecto\\_de\\_la\\_crioconservacion\\_en\\_diferentes\\_especies\\_de\\_hongo/links/5881176daca272b7b441737a/Efecto-de-la-crioconservacion-en-diferentes-especies-de-hongo.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Ayala-Zermeno/publication/288670224_Efecto_de_la_crioconservacion_en_diferentes_especies_de_hongo/links/5881176daca272b7b441737a/Efecto-de-la-crioconservacion-en-diferentes-especies-de-hongo.pdf)
- Monzon, A. (2021). *Producción y uso de hongos entomopatógenos*. Obtenido de CATIEC:  
<https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10698/A0949e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Morales de Leon, A., Jarquin Galvez , R., & Gomez Ruiz , J. (2014). *Evaluación de un formulado de aceite vegetal de Beauveria bassiana en condiciones de laboratorio para el control de la broca del café*. Obtenido de Fitosanidad Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal:  
<https://www.redalyc.org/pdf/2091/209131412001.pdf>

- Moreno Chuquin , D. (2021). *Comparación de dos métodos de producción de Beauveria bassiana y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura*. Obtenido de Zamorano Biblioteca : <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7123>
- Moreno, D. (2021). *Comparación de dos métodos de producción de Beauveria bassiana y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura*. Obtenido de Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2021: <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7123>
- Noboa Guerra , G., & Quelal Guerrero , A. (2015). *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productos de café orgánico de la asociación Río Intag cantón Cotacachi*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana : <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9400>
- Oliveira , I., Pereira , J. A., Albino, B., & Bautista , P. (2011). *Viabilidad de aislamientos de Beauveria bassiana después del almacenamiento bajo varios métodos de conservación*. Obtenido de BMC Anales de Microbiología: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-010-0147-8>
- Ortiz Villacis , J. (Sptiembre de 2021). *Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos presentes en el suelo de las diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua*. Obtenido de Repositorio Universidad Tecnica de Ambato: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33664/1/BQ%20285.pdf>
- Ossa Rodriguez, L., & Galeano, N. F. (2018). *Determinación del mejor método de conservación para mantener la estabilidad bioquímica de Gluconacetobacter Sacchari, almacenada en la colección de microorganismos de la UCM*. Obtenido de Repositorio Universidad Católica de Manizales: <https://repositorio.ucm.edu.co/handle/10839/2253>
- Perez, C., Hartug de Capriles, S., Roselio , C., & Colella , A. (2003). *Mantenimiento de Cryptococcus sp. con el método de Castellani*. Obtenido de Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología: [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562003000200010&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562003000200010&script=sci_arttext)
- Quiancha Coquinche, R., & Zambrano Bosques, J. P. (2022). *Producción de Beauveria bassiana como controlador biológico de insectos plaga en la producción orgánica de*

*hortalizas*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/59568>

Sanchez Sotomayor , H., Orellana Garcia , A., Roel Barahona, I., Marin Bravo , M., Peña Rojas , G., Andia Ayme, V., & Estrada, R. (2021). *Conservación ex situ mediante el establecimiento de cultivo in vitro de semillas de Prosopis limensis “Huarango” de Ica, Perú*. Obtenido de Manglar Revista de Investigacion Cientifica: <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.055>

Torres Gutierrez , R., Valle Ramirez, S. B., Caicedo Quinche , W. O., Abril Saltos, R. V., & Sucoshañay Villalba, D. J. (2020). *Aislamiento y caracterización de Metarhizium spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra Mahanarva andigena (Hemiptera: Cercopidae)*. Obtenido de Ciencia y Tecnología Agropecuaria: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol23\\_num1\\_art:2361](https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2361)

Úbeda Rivera, Y., Martinez Montenegro, M., & López Hernandez, S. (2014). *Evaluación de tres métodos de manejo integrado de Hypothenemus hampei (F), sobre los índices de daño*. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3487/1/228497.pdf>

Vela Nuñez , P. (2020). *Desarrollo de un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas del Hongo Beauveria SPP. a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana*. Obtenido de Repositorio digital Universidad Tecnica del Norte: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10238>

Velez , P., & Lozada , F. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Obtenido de Repositorio digital del Centro Nacional de Investigaciones de Cafe: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/709>

## 14 ANEXOS

Anexo No.1. Tabla de procedimientos métodos de conservación de *Beauveria spp.*

Método de conservación Aceite Mineral
<p>a) Para este proceso se utiliza la estufa GW a 100°C colocando en tubos autoclavables de 15ml con el aceite mineral por 25 minutos.</p> <p>b) Luego de 24 horas se repite el proceso.</p> <p>c) Para continuar se coloca el aceite en los tubos una cantidad de 3ml por tubo este proceso lo realizamos en 5 tubos los cuales inclinaremos a 45° como sugiere (Ayala, 2017), para que se solidifique en este estado.</p> <p>d) Posteriormente se trabaja con otra cepa pura de <i>beauveria spp.</i> que se reactivó anteriormente, este proceso se lo realizara con un aza metálica.</p> <p>e) El aza metálica sirve para realizar un raspado en la cepa de <i>beauveria spp.</i> y seguido raspamos cada tubo con aceite mineral a 45°.</p> <p>f) Seguidamente volvemos a colocar el aceite en cada tubo una cantidad de 8ml por tubo.</p> <p>g) Los tubos quedan semiabiertos debido a que en estas condiciones se propaga el hongo de mejor manera, lo que se aconseja es sellar los tubos con cinta parafilm evitando contaminaciones.</p>
Método de conservación Ultracongelación -70°C
<p>a) Los aislamientos de <i>Beauveria spp.</i> fueron conservados en criotubos de 2ml.</p> <p>b) Se colocaron 3 discos de 5mm en cada tubo, con glicerol doblemente autoclavado.</p> <p>c) Ubicamos en el congelador a -70°C en una gradilla en posición vertical.</p> <p>d) Al transcurrir los 30 días de conservación, pasamos a un refrigerador a 4°C para reducir la temperatura de los tubos.</p> <p>e) Finalmente colocamos los tubos en temperatura 27°C para estabilizar las cepas y poder realizar los aislamientos.</p> <p>f) Con los aislamientos del método de conservación reaislamos para realizar los análisis estadísticos correspondientes.</p>
Método de conservación Agua Destilada Estéril
<p>a) Como primer paso colocamos 1,3ml de agua destilada esterilizada en 10 tubos</p>

eppendorf.

- b) Luego tomamos las cepas puras de *beauveria spp.* y con puntas de 1mm de diámetro realizamos varios cortes circulares en la caja Petri para colocar 3 bloques de la cepa por cada tubo.
- c) En cada tubo colocamos 3 bloques de cepa quedando totalmente sumergidas en el agua destilada esterilizada.
- d) Posteriormente las llevamos a refrigeración a  $-2^{\circ}\text{C}$  para su conservación.
- e) Los análisis de las muestras almacenadas verificaran si el método es apto para la conservación de cepas.

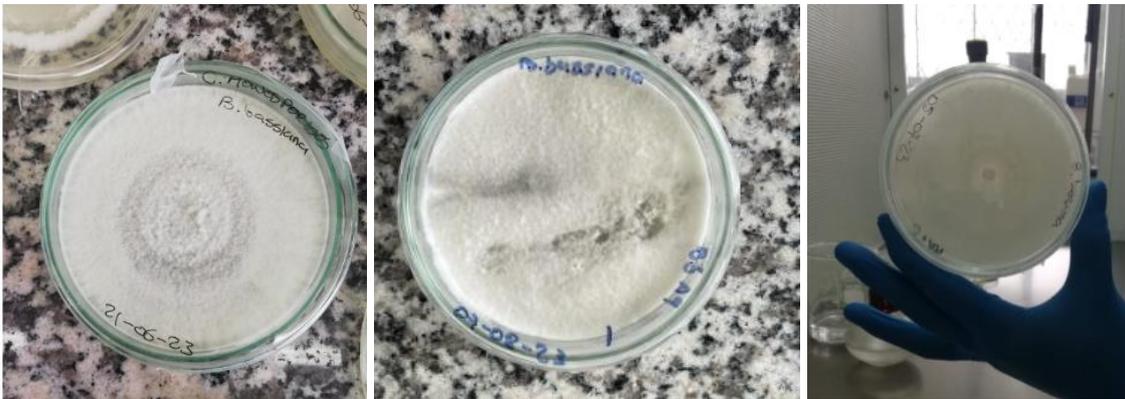
Anexo No.2. Aislamientos de *Beauveria spp.* conservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad CAREN.



Anexo No.3. Materiales para realizar la investigación



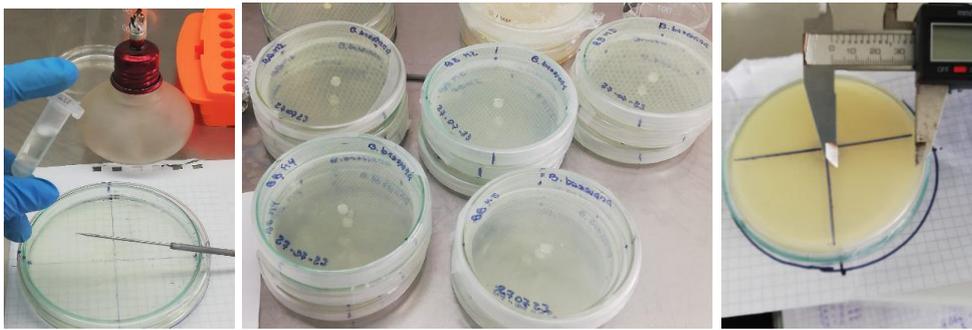
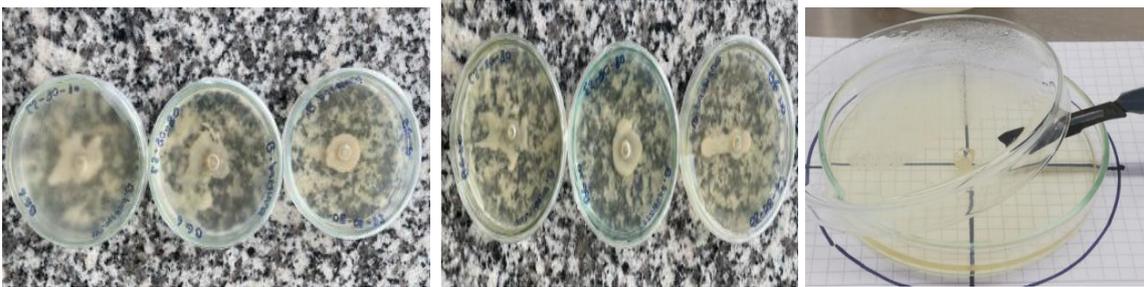
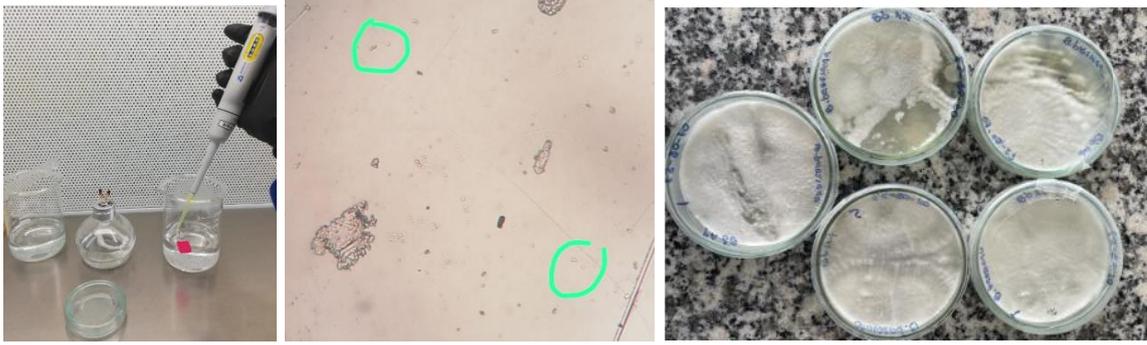
Anexo No.4. Reaislamientos de *Beauveria spp.*



Anexo No.5. Métodos de conservacion de *Beauveria spp.*



Anexo No.6. Resultados obtenidos de la investigacion



Anexo No.7. Aval del Traductor



UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE  
COTOPAXI



CENTRO  
DE IDIOMAS

## *AVAL DE TRADUCCIÓN*

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“CONSERVATION METHODS OF BEAUVERIA SPP. UNDER LABORATORY CONDITIONS LATACUNGA 2023”** presentado por: **Martínez Tubon Christian Andrés**, egresado de la Carrera de Agronomía perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizo bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, agosto del 2023

Atentamente,



BLANCA GLADYS  
SANCHEZ AVILA

MSc. Blanca Gladys Sánchez A.

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC

CI: 2100275375



CENTRO  
DE IDIOMAS