



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE
(*Metarhizium spp*) 2023-2024”**

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

Autor:
Guamantaqui Cruz Edison Gustavo

Tutor:
Chancusig Espín Edwin Marcelo

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Guamantaqui Cruz Edison Gustavo, con cédula de ciudadanía No. 1728141936, declaro ser autor del presente Proyecto de Investigación: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarhizium spp*) 2023-2024”**, siendo el Ingeniero Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín PhD, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 15 de febrero del 2024



Edison Gustavo Guamantaqui Cruz
CC: 172814193-6
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 **GUAMANTAQUI CRUZ EDISON GUSTAVO**, identificado con cédula de ciudadanía **1728141936** 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 **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarizhium spp*) 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: Octubre 2019 – Marzo 2020

Finalización de la carrera: Octubre 2023 – Febrero 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 28 de noviembre del 2023

Tutor: Ing. Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín, PhD.

Tema: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarhizium spp*) 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, **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 15 días del mes de febrero del 2024.



Edison Gustavo Guamantaqui Cruz
EL CEDENTE

Dra. Idalia Eleonora Pacheco Tigsalema
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarizhium spp*) 2023-2024”, de Edison Gustavo Guamantaqui Cruz, 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, 15 de febrero del 2023



Ing. Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín, PhD.

CC: 050114883-7

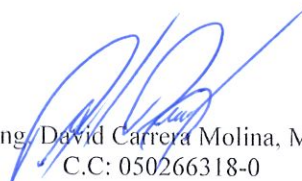
DOCENTE TUTOR

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

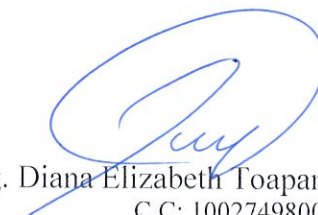
En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Guamantaqui Cruz Edison Gustavo, con el título de Proyecto de Investigación: **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarhizium spp*) 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, 15 de febrero del 2024



Ing. David Carrera Molina, Mg.
C.C: 050266318-0
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.
C.C: 1002749800
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Guido Yauli Chicaiza, MSc.
C.C: 050160440-9
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

A mi Dios por guiarme en mi camino ante todo por mi meta y logro que he soñado durante toda mi vida, a mis padres José Gribaldo Guamantaqui, Martha Cruz y a mi hermana Gabriela Guamantaqui que han sido un apoyo emocional durante la formación personal y profesional por sus consejos durante toda mi vida.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi que me abrió sus puertas para mi formación profesional.

También quiero expresar mi fraterno agradecimiento al Ingeniero Mg. Edwin Marcelo Chancusig, PhD. por su paciencia y colaboración también como no agradecer a la Ingeniera Mg. Diana Toapanta por sus apoyos incondicionales y la confianza me brindó y sus palabras motivadoras que han hecho hincapié para no desmayar y llegar a cumplir mis metas propuestas.

Edison Gustavo Guamantaqui Cruz

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a mis padres queridos José Gribaldo Guamantaqui y Martha Janet Cruz Pila por su amor que tuvieron a mi humilde persona, por ser mi apoyo, sus palabras de aliento que me dieron fuerza.

A mi novia Ileyan Hidalgo y a mi hermana Gabriela Guamantaqui por apoyarme en todo en el transcurso del proceso de titulación y darme fuerzas, con su cariño y amor que me tienen gracias a ellas por estar a mi lado.

Edison Gustavo Guamantaqui Cruz

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA CEPA NATIVA DE (*Metarhizium spp*) 2023-2024”.

Autor:

Guamantaqui Cruz Edison Gustavo

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo determinar de manera integral la identificación morfológica y molecular de una cepa nativa de *Metarhizium spp.*, las cuales se encontraban almacenadas en el laboratorio de la carrera de agronomía. Para ello, se utilizaron técnicas de multiplicación como hisopos, palillos y asa de siembra. Se determinó que los hisopos resultaron ser los más eficaces para obtener *Metarhizium spp.*, ya que mostraron mayor esterilidad y lograron inhibir la contaminación en las cajas Petri en su mayoría. Las cajas que se lograron purificar se pudo observar las estructuras morfológicas de *Metarhizium spp* como hifas, conidiosforos y conidios. Posteriormente, para estar seguros estas muestras se enviaron al laboratorio de BIOHACK ubicado en Quito para el análisis pertinente de identificación molecular. Los resultados obtenidos indicaron que el 100% de las muestras contenían una sola especie, la cual fue identificada como *Metarhizium anisopliae*. Este proyecto de investigación contribuirá significativamente a la comprensión y caracterización de *Metarhizium anisopliae*, lo que tiene importantes implicaciones para su aplicación efectiva en el control biológico de plagas agrícolas y forestales, promoviendo así prácticas sostenibles y amigables con el medio ambiente en el manejo de cultivos y ecosistemas.

Palabras claves: Identificación morfológica, Identificación molecular, Reactivación, BIOHACK, *Metarhizium anisopliae*, Control biológico, Prácticas sostenibles.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

THEME: “MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE NATIVE STRAIN OF (*Metarhizium spp*) 2023-2024”.

Athor:
Guamantaqui Cruz Edison Gustavo

ABSTRACT

The objective of this research project was to comprehensively determine the morphological and molecular identification of a native strain of *Metarhizium spp.*, that were stored in the laboratory of the agronomy department. For this purpose, multiplication techniques such as swabs, sticks and sowing loop were used. It was determined that the swabs proved to be the most effective for obtaining *Metarhizium spp.*, since they showed greater sterility and were able to inhibit contamination in the Petri dishes for the most part. The boxes that were successfully purified showed the morphological structures of *Metarhizium spp.* Subsequently, to be sure, these samples were sent to the BIOHACK laboratory located in Quito for the relevant molecular identification analysis. The results obtained indicated that 100% of the samples contained a single species, which was identified as *Metarhizium anisopliae*. This research project will contribute significantly to the understanding and characterization of *Metarhizium anisopliae*, which has important implications for its effective application in the biological control of agricultural and forestry pests, thus promoting sustainable and environmentally friendly practices in crop and ecosystem management.

KEYWORDS: Morphological identification, Molecular identification, Reactivation, BIOHACK, *Metarhizium anisopliae*, Biological control, Sustainable and environmentally friendly practices.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	ii
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	3
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	3
3.1.Beneficiarios Directos.....	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
5. OBJETIVOS:.....	5
5.1.General.....	5
5.2.Específicos.....	5
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOSPLANTEADOS	6
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	8
7.1.Clasificación taxonómica <i>Metarhizium</i> spp.....	8
7.2. <i>Metarhizium</i> spp.	8
7.3.Donde se encuentra el hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	8
7.4.Plagas que ataca el hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	9
7.5.Características del hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	9
7.6.Temperatura de crecimiento de <i>Metarhizium</i> spp.	10
7.7.Mecanismos de acción del hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	10
7.8.Microorganismos Benéficos.	11
7.9.Impacto de los Macroorganismos Benéficos en el suelo.....	11
7.10. Influencia de la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo.....	12
7.11. Utilización de los Microorganismos Benéficos en el suelo.	12
7.12. Actividades que desempeñan los Microorganismos Benéficos en el suelo.....	13
8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS	13
8.1.Pregunta Científica.....	13

9.	METODOLOGÍA.....	13
9.1.	Tipos de investigación	13
9.1.1.	Investigación bibliográfica	13
9.2.	Métodos de investigación	13
9.2.1.	Cualitativo.....	13
9.3.	Ubicación de la investigación	14
9.4.	Materiales y reactivos.	14
9.5.	Equipos utilizados para realizar la investigación.....	15
9.6.	Métodos de multiplicación.....	15
9.7.	Antibiótico (Megacilina).....	16
9.8.	Extracción de ADN de la muestra para realizar la identificación molecular de Metarhizium spp.	16
10.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	17
10.1.	Observación macroscópica de Metarhizium spp.	17
10.2.	Uso de antibiótico	18
10.3.	Observación microscópica.....	19
	Tabla 7: Equipos de laboratorio.....	19
10.4.	Identificación Morfología de Metarhizium spp.	21
10.5.	Identificación molecular de Metarhizium spp.	25
10.5.1.	Interpretación del análisis molecular.....	25
11.	Presupuesto del proyecto	28
12.	IMPACTOS (SOCIALES, AMBIENTALES Y ECONÓMICOS).....	29
12.1.	Impacto social.....	29
12.2.	Impacto ambiental.....	29
12.3.	Impacto económico.....	29
13.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
	Conclusiones.....	29
	Recomendaciones	30
14.	BIBLIOGRAFÍAS	31
15.	ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actividades a realizar en la investigación	6
Tabla 2: Clasificación taxonómica del <i>Metarhizium</i> spp.	8
Tabla 3: Plagas de importancia económica controladas con el hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	9
Tabla 4: Materiales y reactivos utilizados para realizar la investigación	14
Tabla 5: Equipos del laboratorio	15
Tabla 6: Comparación de las cajas Petri utilizando antibiótico.....	19
Tabla 7: Equipos de laboratorio.....	19
Tabla 8: Características morfológicas de <i>Metarhizium</i> spp. vistas a través del microscopio ...	21
Tabla 9: Visualización de <i>Metarhizium</i> spp., en el microscopio.....	22
Tabla 10: Costos del proyecto de investigación	28

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos .- 1: Resultado del análisis molecular masivo de la cepa nativa de <i>Metarhizium</i> spp, enviada a BIOHACK UIO Community Lab.	39
Anexos. - 2 : Observación de la cepa nativa de <i>Metarhizium</i> spp. conservada.....	41
Anexos. - 3: Materiales y equipos para la reactivación de <i>Metarhizium</i> spp.	41
Anexos. - 4: Toma de fotos del proceso de reactivación de <i>Metarhizium</i> spp.....	44
Anexos. - 5: Segundo intento de reactivación utilizando antibiótico.....	45
Anexos. - 6: Crecimiento de <i>Metarhizium</i> spp. en 7 días.....	45
Anexos. - 7: Lente usado para identificar es 20x/0.40Ph1.	46
Anexos. - 8: Toma de fotos de proceso de identificación morfológica en el microscópica de <i>Metarhizium</i> spp.	46
Anexos .- 9: Aval del Traductor	47

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“Identificación morfológica y molecular de la cepa nativa de (*Metarhizium spp*) 2023-2024”

Fecha de inicio:

Octubre 2023

Fecha de finalización:

Febrero 2024

Lugar de ejecución:

Universidad Técnica de Cotopaxi, en las instalaciones de laboratorio de la carrera de Agronomía.

Facultad que auspicia

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Carrera de Agronomía

Equipo de Trabajo:

Tutor: Ing. Edwin Marcelo Chancusig Espín, Mg.PhD.

Lector 1: Ing. Carrera Molina Santiago Carrera, Mg.

Lector 2: Ing. Diana Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

Lector 3: Ing. Guido Yauli Chicaiza, MSc.

Coordinador del Proyecto:

Guamantaqui Cruz Edison

Gustavo

Teléfonos: 0939517315

Correo electrónico: edison.guamantaqui1936@utc.edu.ec

Área de Conocimiento:

Agricultura- Agricultura, silvicultura y pesca- Agronomía

Línea de investigación:

Desarrollo y Seguridad alimentaria

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Producción Agrícola Sostenible

Línea de vinculación de la carrera:

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El uso extendido de insecticidas químicos plantea serias preocupaciones tanto para el medio ambiente como para la salud humana y la economía agrícola. Es evidente la necesidad de buscar alternativas más sostenibles y seguras para el control de plagas en los cultivos. Una opción prometedora radica en el empleo de hongos entomopatógenos, los cuales ofrecen múltiples ventajas desde perspectivas económicas, ambientales y de salud. En contraste con los métodos convencionales basados en productos químicos, el uso de estos hongos permite una reducción significativa en la toxicidad para los agricultores y un menor impacto ambiental. (Asela M. del Puerto Rodríguez, Susana Suárez Tamayo, Daniel E. Palacio et al., 2014)

Este enfoque también ofrece la flexibilidad de ser combinado con otros métodos de control, como el manejo integrado de plagas y el control cultural, lo que potencialmente amplifica su eficacia y reduce los riesgos asociados con la resistencia de las plagas. Si bien es cierto que la implementación inicial de estos métodos puede implicar costos adicionales, a largo plazo, los beneficios derivados de la preservación del medio ambiente, la salud humana y la sustentabilidad agrícola superan con creces estas inversiones iniciales. (Viera-Arroyo et al., 2020)

En el contexto específico de Ecuador, un país con una rica biodiversidad y una agricultura diversificada, la búsqueda de biocontroladores nativos, como *Metarhizium spp*, se alinea perfectamente con los principios de la agroecología y el manejo agroecológico. Este proyecto de investigación tiene como objetivo ofrecer una alternativa viable y eficaz para el control de plagas que respete los equilibrios naturales y promueva la seguridad alimentaria y el bienestar de los agricultores locales. En última instancia, esta investigación busca contribuir a la construcción de un sistema agrícola más resiliente, sostenible y equitativo en Ecuador. (Intriago & Amézcuca, 2016)

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Beneficiarios Directos

La Universidad Técnica de Cotopaxi, carrera de Ingeniería Agronómica junto a los estudiantes pertenecientes a la carrera de agronómica.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La mayoría de las enfermedades de plantas generalmente se controlan con fungicidas químicos, los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y fruto. Las consecuencias negativas sobre la salud, la contaminación del ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia, ha generado la búsqueda de alternativas de reemplazo con la incorporación de agentes biológicos. El control biológico (CB) utiliza organismos vivos; involucra también microorganismos cuya actividad biológica disminuye el daño causado por los patógenos de las plantas. (Viera-Arroyo et al., 2020)

Debido a este hongo entomopatógeno se logra reducir o eliminar la incidencia del fitopatógeno. Independientemente de su actividad, un agente biocontrol eficaz debe tener la capacidad de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado. (Zuccarelli, 2019)

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos, con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Metarhizium spp.*, se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; para su producción masiva en condiciones in vitro tiene la capacidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo. (Valle-Ramírez et al., 2022)

Los hongos entomopatógenos poseen características que definen muy bien sus posibilidades como biocontroladores, por su alto poder patogénico y capacidad de producir epífitas; sin embargo, su producción a escala comercial e industrial presenta algunos inconvenientes como el desconocimiento de sustratos alternativos eficientes, infraestructura y equipo mínimo necesario; situación que ha limitado su desarrollo y utilización a mayor escala. Existen diferentes métodos para reproducir a *Metarhizium spp.*; sin embargo, tienen un costo elevado. Uno de los sustratos más utilizados es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto, por lo cual se pretende incorporar el uso de sustratos regionales para su reproducción. (Pucheta Díaz et al., 2006)

5. OBJETIVOS:

5.1.General

Identificar morfológicamente y molecularmente de una cepa nativa de *Metarhizium spp.*, preservada en el laboratorio de la carrera de agronomía durante el período 2023-2024.

5.2.Específicos

- Reactivar cepas nativas de *Metarhizium spp.* el laboratorio de la carrera de agronomía.
- Identificar morfológicamente y molecularmente de la cepa nativa de *Metarhizium spp.*
- Detallar los costos del proyecto de investigación.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 1: *Actividades a realizar en la investigación*

Objetivos Específicos	Actividad (tarea)	Responsable	Medio de verificación
<ul style="list-style-type: none"> Reactivar cepas nativas de <i>Metarhizium spp.</i> del laboratorio de la carrera de agronomía. 	<ul style="list-style-type: none"> Elegir cepas de <i>Metarhizium spp.</i> almacenadas en el laboratorio, considerando su viabilidad. Observar en el microscopio la morfología de <i>Metarhizium spp.</i> Preparación medios de cultivo adecuado para el crecimiento de <i>Metarhizium spp.</i> Utilizar técnicas de multiplicación como hisopos, palillos y asa de siembra. 	Edison Guamantaqui	<ul style="list-style-type: none"> Imágenes de las cepas de <i>Metarhizium spp.</i>
<ul style="list-style-type: none"> Identificar morfológicamente y molecularmente de la cepa nativa de <i>Metarhizium spp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Preparar laminas microscopicas con <i>Metarhizium spp.</i> Observar las características morfológicas de la cepa, como la forma y tamaño de las esporas, la estructura del micelio, la presencia de conidios y conidióforos. 	Edison Guamantaqui	<ul style="list-style-type: none"> Imágenes de las estructuras morfológicas de la cepa de <i>Metarhizium spp.</i>

	<ul style="list-style-type: none"> • Capturar imágenes de las características morfológicas para su posterior análisis y referencia. • Realizar una descripción detallada de las características morfológicas observadas, incluyendo dimensiones, forma, color y disposición de las diferentes estructuras. 		
<ul style="list-style-type: none"> • Detallar los costos del proyecto de investigación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Realización de tablas de presupuestos de investigación. 	Edison Guamantaqui	<ul style="list-style-type: none"> • Tablas de Excel.

Elaborado por: (Guamantaqui Edison, 2024).

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Clasificación taxonómica *Metarhizium spp*

El hongo *Metarhizium spp.* es un tipo de hongo entomopatógeno incompleto que pertenece a la división Ascomycota, la clase Sordariomycetes, el orden Hypocreales y la familia Clavicipitaceae. Se destaca por su capacidad de reproducirse de manera asexual y por su habilidad para atacar a una amplia variedad de especies de insectos.

Tabla 2: Clasificación taxonómica del *Metarhizium spp.*

Taxonomía	
Reino.....	Fungi
División.....	Ascomycota
Clase.....	Sordariomycetes
Orden.....	Hypocreales
Familia.....	Clavicipitaceae
Subfamilia.....	Tillandsioideae
Género.....	<i>Metarhizium.</i>

Nota: Recuperado de (Falvo, 2019)

7.2. *Metarhizium spp.*

Metarhizium spp., un hongo de amplia distribución natural, se localiza con facilidad en diversos ambientes, incluyendo suelos, rastrojos de cultivos, estiércol, así como en plantas e insectos. Este microorganismo fue uno de los cinco primeros en ser empleados para el control biológico y se destaca por su prevalencia a nivel mundial. (Pavone, 2021)

7.3. Donde se encuentra el hongo *Metarhizium spp*

Metarhizium spp es un hongo que se encuentra comúnmente en la naturaleza y está ampliamente distribuido en suelos, rastrojos de cultivos, estiércol, así como en plantas e insectos. Este microorganismo fue uno de los primeros cinco agentes microbianos utilizados para el control biológico, y es reconocido por su prevalencia a nivel mundial. (Pavone, 2021)

7.4. Plagas que ataca el hongo *Metarhizium spp*

Metarhizium spp tiene la capacidad de parasitar a más de 300 especies de insectos pertenecientes a diferentes órdenes. Los insectos que son afectados por este hongo muestran una cubierta completa de micelio sobre sus cuerpos después de la muerte. Inicialmente, el micelio es de color blanco, pero adquiere una tonalidad verde cuando el hongo comienza a esporular (Hernández-Rosas et al., 2019).

Tabla 3: 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>

Nota: Recuperado de (Hernández-Rosas et al., 2019)

7.5. Características del hongo *Metarhizium spp*

Las colonias de *Metarhizium spp* se adhieren completamente al medio de cultivo y adoptan una forma redonda, exhibiendo un color verde que varía según el tipo de aislamiento (Luz et al., 2019).

Los conidióforos muestran una ramificación irregular, con aproximadamente 2-3 ramas por septo, y tienen una longitud que oscila entre 4-14 μm , con un diámetro de 1.5-2.5 μm (Alcantara-Vargas et al., 2020).

Las fialides, por su parte, son de forma cilíndrica con un ensanchamiento en el ápice, midiendo entre 6-13 μm de longitud y 2-4 μm de diámetro (Basulto et al., 2022).

Los conidios, generalmente uninucleados, tienen una longitud que varía entre 3-9 μm y un diámetro de 1.5-3.5 μm (Negrete Franklin, 2023).

La temperatura y la humedad desempeñan un papel crucial en el proceso de infección y esporulación del hongo frente a la presencia de agentes externos. En un entorno de laboratorio, la germinación de los conidios puede iniciarse aproximadamente a las 12 horas, con una temperatura que oscila entre 23 y 30°C, y una humedad relativa superior al 90% (Athanassiou et al., 2008).

Imagen 1: Cultivos del hongo *Metarhizium spp.*



Elaborado por: (Guamantaqui Edison, 2024)

7.6. Temperatura de crecimiento de *Metarhizium spp.*

La temperatura óptima para el crecimiento y la actividad de *Metarhizium spp* varía según la especie y las condiciones específicas del medio ambiente. Sin embargo, en general, *Metarhizium spp* prospera en temperaturas moderadas y cálidas. (Matabanchoy Solarte et al., 2012)

En condiciones de laboratorio y en aplicaciones de control biológico, se ha observado que *Metarhizium spp* suele crecer bien en un rango de temperatura entre aproximadamente 20°C y 30°C. Dentro de este rango, la mayoría de las especies de *Metarhizium spp* pueden germinar, colonizar y esporular eficientemente. (Cañedo & Ames, 2004)

Es importante tener en cuenta que las diferentes cepas de *Metarhizium spp* pueden tener preferencias ligeramente diferentes en cuanto a la temperatura óptima de crecimiento. Además, factores como la humedad relativa y la disponibilidad de nutrientes también pueden influir en la capacidad del hongo para crecer y prosperar del tejido del insecto, colonizando totalmente el cuerpo del insecto. (Valle et al., 2021)

7.7. Mecanismos de acción del hongo *Metarhizium spp*

El hongo entomopatógeno atraviesa varias fases para desarrollarse en su huésped, que incluyen la germinación, la formación de apresorios, la creación de estructuras de penetración, la colonización y la reproducción. El inóculo, o unidad infectiva, está compuesto por las esporas y conidios, formas de reproducción sexual y asexual, respectivamente. (Vega et al., 2012)

El proceso comienza cuando una espora se adhiere a la cutícula del insecto, generando un tubo germinativo y un apresorio que facilita la penetración en el insecto. Para la penetración, se emplean dos mecanismos: uno físico, que rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula, y otro químico, que implica la acción enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas),

causando la descomposición del tejido en el sitio de penetración. (Contreras Arias et al., 2021)

7.8. Microorganismos Benéficos.

Los microorganismos beneficiosos son aquellos organismos microscópicos presentes en el suelo que desempeñan funciones positivas para los ecosistemas agrícolas y la salud del suelo. Estos microorganismos incluyen bacterias, hongos y otros organismos que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno, la supresión de enfermedades del suelo y la promoción del crecimiento de las plantas. En este contexto, *Metarhizium*, un hongo entomopatógeno, puede interactuar de manera beneficiosa al controlar las poblaciones de insectos plaga que dañan los cultivos. (Manzi & Mayz, 2003)

Además, *Metarhizium spp.* puede colaborar con otros microorganismos beneficiosos al descomponer los restos de insectos muertos, liberando nutrientes en el suelo que son utilizados por las plantas. Sin embargo, es importante considerar las interacciones complejas entre *Metarhizium spp.* y otros microorganismos beneficiosos, así como su influencia en la dinámica del suelo y la salud del ecosistema agrícola. (Obando B. et al., 2013)

Los microorganismos beneficiosos, como *Metarhizium*, pueden contribuir significativamente a la sostenibilidad agrícola al ofrecer alternativas naturales al control de plagas y al mejorar la fertilidad del suelo. La presencia de *Metarhizium* puede reducir la dependencia de los agricultores en pesticidas químicos, promoviendo así prácticas agrícolas más amigables con el medio ambiente y sostenibles a largo plazo. Además, la interacción entre *Metarhizium* y otros microorganismos beneficiosos en el suelo puede aumentar la biodiversidad microbiana y promover una mayor estabilidad del ecosistema. En conjunto, la presencia y la interacción de los microorganismos beneficiosos, incluido *Metarhizium*, pueden tener un impacto positivo en la productividad agrícola y la salud del suelo, ayudando a mantener sistemas agrícolas más resilientes y equilibrados. (Cruz-Cárdenas et al., 2021)

7.9. Impacto de los Macroorganismos Benéficos en el suelo.

Los microorganismos beneficiosos en el suelo desempeñan un papel vital en la salud del suelo y la productividad agrícola al participar en la descomposición de materia orgánica, liberar nutrientes esenciales, fijar nitrógeno atmosférico, controlar enfermedades del suelo y mejorar la estructura del suelo. Su actividad promueve la fertilidad del suelo, la disponibilidad de nutrientes para las plantas y la sostenibilidad a largo plazo de la agricultura, contribuyendo así al desarrollo de sistemas agrícolas resilientes y saludables. (Silva et al., 2020)

7.10. Influencia de la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo.

La biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo ejerce una influencia significativa en la salud y la fertilidad del ecosistema del suelo. Esta diversidad microbiana contribuye a múltiples funciones ecológicas, como la descomposición de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno, la producción de enzimas y la supresión de enfermedades del suelo. (Samaniego-Gaxiola, 2021)

Cuanta mayor sea la diversidad de microorganismos beneficiosos, mayor será la capacidad del suelo para mantener su estructura y funcionamiento, lo que resulta en una mejor disponibilidad de nutrientes para las plantas, una mayor resistencia a enfermedades y una mayor capacidad para tolerar condiciones ambientales adversas. (Rodríguez-Rodríguez et al., 2023)

Además, la biodiversidad de microorganismos en el suelo contribuye a la estabilidad del ecosistema y al mantenimiento de la productividad agrícola a largo plazo al proporcionar servicios ecosistémicos esenciales para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y la biodiversidad global del suelo. En resumen, la biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo es fundamental para la salud del suelo y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y ecológicos. (Salamone & Eugenia, 2011)

7.11. Utilización de los Microorganismos Benéficos en el suelo.

Los microorganismos benéficos desempeñan una variedad de roles fundamentales en la salud del suelo y la productividad agrícola. Contribuyen a la promoción de la salud del suelo al mejorar su estructura, fertilidad y capacidad para sostener la vida vegetal. Además, facilitan la descomposición de materia orgánica, liberando nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Al mismo tiempo, algunos de estos microorganismos tienen la capacidad de suprimir patógenos del suelo, reduciendo así la incidencia de enfermedades en las plantas y permitiendo una reducción en la dependencia de químicos como fertilizantes y pesticidas. (Correa, 2013)

Esta reducción de productos químicos promueve prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Además, contribuyen a mejorar el rendimiento de los cultivos al facilitar la absorción de nutrientes y mejorar la resistencia de las plantas a condiciones adversas. La conservación de la biodiversidad del suelo también se ve beneficiada por la presencia y actividad de estos microorganismos, lo que contribuye a la estabilidad a largo plazo del ecosistema. Entre las actividades específicas que desempeñan, se incluye la descomposición de materia orgánica, como lo hace *Metarhizium spp.* al descomponer restos de insectos, liberando nutrientes utilizables por las plantas, y aunque no fijan directamente nitrógeno, su control sobre poblaciones de insectos puede indirectamente liberar nitrógeno en

el suelo a través de la descomposición de materia orgánica.(Reyes & Valery, 2007)

7.12. Actividades que desempeñan los Microorganismos Benéficos en el suelo

Metarhizium spp., como microorganismo beneficioso en el suelo, desempeña múltiples roles clave en la agricultura sostenible. Entre estos, se destaca su contribución a la descomposición de materia orgánica, liberando nutrientes esenciales para las plantas a partir de insectos muertos. Aunque no fija directamente nitrógeno, controla poblaciones de insectos, lo que puede liberar nitrógeno a través de la descomposición de la materia orgánica consumida por estos insectos. Además, *Metarhizium spp.* sintetiza vitaminas y hormonas que promueven el crecimiento y la salud de las plantas, produce enzimas para descomponer insectos y controla plagas, regulando las poblaciones y protegiendo las plantas. Su presencia también promueve la biodiversidad del suelo y estimula el crecimiento de raíces, mejorando la absorción de agua y nutrientes por las plantas. Finalmente, al proporcionar un método de control biológico de plagas, ayuda a reducir la dependencia de pesticidas químicos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.(Acuña Jiménez et al., 2015)

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTA CIENTÍFICA O HIPÓTESIS

8.1. Pregunta Científica

“¿Cuál es la diversidad genética y morfológica de la cepa nativa de *Metarhizium spp* aislada en el período 2023-2024, y cómo se relaciona esta diversidad con su potencial como agente de control biológico de plagas en el entorno agrícola?”

9. METODOLOGÍA

9.1. Tipos de investigación

9.1.1. Investigación bibliográfica

Este proceso implica la búsqueda y recopilación de información bibliográfica disponible, incluyendo artículos científicos, libros, tesis y documentos relacionados con el tema de los agentes biocontroladores. Se lleva a cabo un análisis exhaustivo de esta información, resaltando los aspectos más relevantes y pertinentes para la elaboración del documento del proyecto de investigación. Este enfoque permite la construcción de nuevos conocimientos y aporta al desarrollo de la investigación en cuestión.

9.2. Métodos de investigación

9.2.1. Cualitativo

La observación detallada de las características físicas del hongo (morfológicas), así como el

análisis de su composición genética y molecular. Esto implica identificar y describir aspectos como la forma, el tamaño, el color y las estructuras del hongo, así como determinar su identidad genética y posiblemente su variabilidad genética (molecular).

9.3.Ubicación de la investigación

La presente investigación se realizó en la universidad técnica de Cotopaxi campus Salache, está dentro del perímetro rural cantón Latacunga, ubicada al suroeste de la cabecera cantonal, junto a la E35 en el km 7,53 vía Salache a 2,870 msnm su temperatura media es de 13,6°C.

Imagen 2: Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi



Fuente: Universidad Técnica de Cotopaxi (Google maps, 2024)

9.4.Materiales y reactivos.

Tabla 4: *Materiales y reactivos utilizados para realizar la investigación*

Materiales	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> ● Cajas Petri (40 unidades) ● Asa de siembra metálica (1 unidad) ● Estuche de disección (1 unidad) ● Hisopos (200 unidades) ● Palillos (30 unidades) ● Papel absorbente (3 unidad) ● Papel aluminio (4 rollos) ● Mechero (1 unidad) ● Jeringuilla de 10 ml (4 unidades) ● Cámara de flujo (1 unidad) ● Agua destilada (5 litros) 5000 ml ● Guantes quirúrgicos (50 unidades) ● Rotulador (1 unidad) ● Papel film (30 metros) 	<ul style="list-style-type: none"> ● PDA ● Alcohol al 96% (15 litros) ● Agua destilada (5 litros) 5000 ml ● Cloro (10 litros)

Elaborado por: (Guamantaqui Edison, 2024)

9.5. Equipos utilizados para realizar la investigación

Tabla 5: Equipos del laboratorio

Equipos del laboratorio	Marca	Modelo	Cantidad
Autoclave	TUTTNAVER	2540M	1
Incubadora	REBELK	RI-50	1
Cámara de flujo laminar	BIOBASE	BBS-DDS. CN BBS-H1300	1
Balanza	HOCHOICE	HC500	1

Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024)

Se obtuvieron imágenes de las muestras de *Metarhizium spp.* recolectadas en el laboratorio de la carrera de agronomía para su visualización bajo el microscopio.

9.6. Métodos de multiplicación

- **Hisopos**

La recolección de cepas obtenidas en la Universidad Técnica de Cotopaxi, se contamina la parte algodónada del material con la intención de aumentar la propagación del hongo en el medio nutritivo, aumentando la cantidad de colonias que se pueden formar y se puede lograr purificar, entre más cantidad de colonias se logren obtener el resultado podrá ser de mejor calidad para el análisis molecular. (Téllez-Jurado et al., 2009)

- **Palillos**

La recolección de cepas obtenidas en la Universidad Técnica de Cotopaxi, se contamina la parte puntiaguda y de madera del material con la intención de aumentar la propagación del hongo en el medio nutritivo, aumentando la cantidad de colonias que se pueden formar y se puede lograr purificar, entre más cantidad de colonias se logren obtener el resultado podrá ser de mejor calidad para el análisis molecular. (Rodríguez S. et al., 2006)

- **Asa de siembra**

Las asas de siembra (a veces llamadas microestriadores o varillas de inoculación) son dispositivos de mano para inocular medios de crecimiento de placas o tubos con microorganismos como bacterias o levaduras antes de la incubación, la multiplicación y el crecimiento. (Bustamante, 2019).

Reactivación de *Metarhizium spp.*

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi con todas las medidas de bioseguridad y con los equipos con los que cuenta el laboratorio, para el aislamiento de los hongos se realizó con la técnica del rayado (Sarabia & Roo, 2014).

Para la reactivación se preparó en 200 ml de agua destilada 7,8 g de (PDA) para 10 cajas Petri, asas de siembra, pinzas deben ser coloca en el autoclave con un tiempo de 40 minutos a una temperatura 120 °C y 140 °F para la esterilización y preparación del medio, lo sacamos del autoclave para que se enfríe hasta eso debemos desinfectar la cámara de flujo laminar donde se debe trabajar con las muestras y todos los materiales necesarios como: mechero con alcohol 96%, cajas Petri de 60×15 mm, alcohol al 96% en un vaso de precipitación para la desinfección de asas de siembra y pinzas, para el aislamiento.

Fórmula para la preparación del medio de cultivo (PDA)

$$\frac{1000 \text{ ml} \text{ --- } 39 \text{ g}}{200 \text{ --- } X} = X = \frac{200 * 39}{1000} = 7,8 \text{ g}$$

Se colocaron en cada caja Petri 20 ml de (PDA), se debe esperar dos minutos para que el medio se enfríe. Se utilizaron varias técnicas de multiplicación como es con hisopos, palillos y asa de siembra luego de haber multiplicado, serán rotulados con fecha, número de muestra, nombre del responsable, el medio de cultivo que se utiliza lo sellamos con papel film y lo llevamos a la incubadora con 26 °C estarán durante los 7 días.

Se obtuvieron imágenes de las muestras de *Metarhizium spp.* recolectadas en el laboratorio de la carrera de agronomía para su visualización bajo el microscopio.

9.7. Antibiótico (Megacilina)

La aplicación del antibiótico inhibe el desarrollo del crecimiento de bacterias que afectaría a la propagación de las colonias formadoras de hongos, para un análisis molecular se necesita una obtención pura del hongo como tal, pueden atacar directamente la pared de la célula bacteriana, que lesiona la célula. Las bacterias ya no pueden atacar al cuerpo, lo que evita que estas células hagan más daño dentro del cuerpo. Otros antibacterianos (por ejemplo, tetraciclina, eritromicina) bloquean el crecimiento y reproducción de las bacterias. (De la Fuente-Salcido et al., 2015)

9.8. Extracción de ADN de la muestra para realizar la identificación molecular de *Metarhizium spp.*

Se llevo la cepa nativa de *Metarhizium spp.* que fue aislada en el laboratorio de la Universidad Técnica De Cotopaxi, las mismas que se dejó en las instalaciones de BIOHACK UIO para su respectiva extracción de ADN, para ello se verifico primero la calidad y cantidad de ADN para realizar la identificación molecular por metagenómica para obtener los primeros resultados y

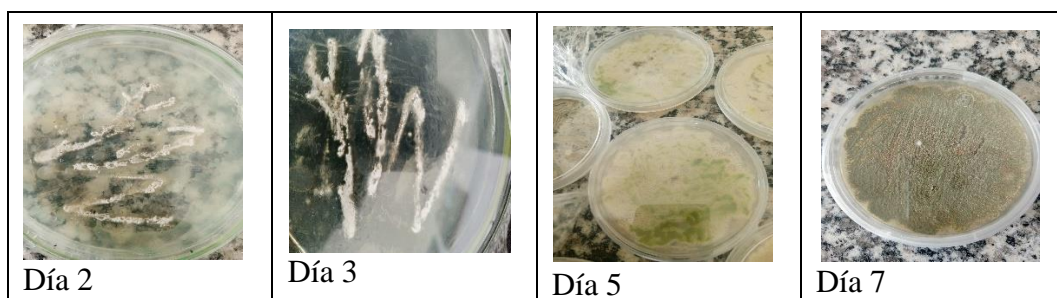
determinar la especie de *Metarhizium spp.* con la que cuenta el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1. Observación macroscópica de *Metarhizium spp.*

Observación macroscópica durante los 7 días de crecimiento del hongo *Metarhizium spp* con una temperatura de 26 °C en la incubadora.

Imagen 3: Crecimiento radial de (*Metarhizium spp*), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo



Elaborado por: (Guamantaqui Edison,2024)

La cepa aislada presentó características típicas del género (*Metarhizium spp*), con un inicio de crecimiento micelial de color blanco, seguido por la producción de conidios de tonalidad verde claro, acompañada de una notable abundancia de los mismos(Silva et al., 2020).

Crecimiento del hongo al 2 día:

Las colonias del hongo se encuentran en una fase inicial de desarrollo, evidenciando un crecimiento inicial que se presenta en forma de un color blanco con aspecto algodonoso. Este fenómeno sugiere que el hongo se encuentra en una etapa de crecimiento activo y está colonizando el medio de cultivo.

Crecimiento del hongo al 3 día:

En este momento, las colonias han alcanzado su pleno desarrollo y ocupan toda la superficie de la caja Petri. El color blanco algodonoso ha evolucionado hacia un tono verde claro en el centro de las colonias. Este cambio indica una posible alteración en la composición del medio de cultivo y podría implicar la producción de pigmentos distintivos por parte del hongo.

Crecimiento del hongo al 5 día:

En este punto, las colonias han llegado a su fase completa de crecimiento y abarcan todo el

espacio de la caja Petri. El tono blanco algodonoso ha cambiado a un verde claro en el centro de las colonias, sugiriendo una modificación en la composición del medio de cultivo y la potencial generación de pigmentos característicos por parte del hongo.

Crecimiento del hongo al 7 día:

El color verde más pronunciado de las colonias indica un avance en el crecimiento y la maduración del hongo. La textura algodonosa sugiere la acumulación de esporas y una preparación para la fase de esporulación. La observación de hifas lisas y conidias de distintos tonos verdes confirma que el hongo es del género *Metarhizium spp.*

A los siete días de crecimiento, todas las colonias adquirieron un tono verde, indicando la maduración de la cepa para la esporulación. Según Aguilera-Cogley et al., (2020), los aislados nativos de *Metarhizium spp.*, provenientes de hongos entomopatógenos, mostraron colonias inicialmente blancas que luego se volvieron de un verde claro.

De acuerdo con Castro López & Martínez Osorio, (2019) el crecimiento del hongo es inicialmente blanco algodonoso en su etapa joven, pero a medida que madura adquiere una coloración verde oscura. Se caracteriza por hifas hialinas y septadas, con conidióforos cortos, fiálides solitarias, en pares o en racimos, de las cuales se forman los conidios en cadenas. Los conidios son cilíndricos, unicelulares, de longitud de 3,5 a 8µm y de ancho de 1.5-2.5µm, hialinos o ligeramente pigmentados, con estomas carnosos. Según (Hernandez et al., 2019) lo caracterizan por presentar micelio de color verde oliva, con hifas lisas y septadas, conidióforos en montículos bajos, cubiertos por conidios, erectos, ramificados, agrupados estrechamente o ligeramente, formando una capa esporulante.

10.2. Uso de antibiótico

En los resultados obtenidos se vieron que ya no existe aparición de *Aspergillus* con la adición de antibiótico (Megacilina), para el análisis molecular masivo se necesita que la muestra este pura y de 4 días por lo máximo.

Tabla 6: Comparación de las cajas Petri utilizando antibiótico

Colocación de antibiótico en el PAD	Caja Petri de <i>Metarhizium spp.</i> con antibiótico
	

Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024).

Según Aguilera-Cogley, Jaén-Torrijos, Ávila-Rodríguez, Herrera-Vásquez, Jaén-Sanjur, Barba-Alvarado, et al., (2020) ,el empleo de antibióticos en la multiplicación de hongos entomopatógenos se ha convertido en una práctica convencional en la microbiología agrícola. La adición controlada de antibióticos al medio de cultivo inhibe el crecimiento de bacterias contaminantes, garantizando así la pureza y la eficacia de los cultivos de hongos. Este método ha demostrado ser fundamental para mantener la calidad y la viabilidad de los hongos entomopatógenos.

10.3. Observación microscópica

Para la identificación del hongo que fue cultivado y aislado en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi el (09/01/2024), se mantuvo en incubación durante un periodo de 7 días a una temperatura de 26 °C.

Tabla 7: Equipos de laboratorio

	Marca	Modelo	Cantidad
• Microscopio	OLYMPUS	CX31RBSFA	1

Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024).

Posteriormente, se tomaron muestras de los hongos aislados utilizando un asa, las cuales se dispusieron sobre portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos. Seguidamente, los portaobjetos fueron colocados en el microscopio, utilizando el objetivo con lente

(20x/0.40Ph1.), con el propósito de examinar las estructuras desarrolladas durante su crecimiento en el medio de cultivo.

Imagen 4: Visualización de *Metarhizium spp.* en el microscopio.



Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024)

Se observó una cantidad reducida de *Metarhizium spp.*, en las 10 cajas Petri reactivadas, posteriormente a esto se realizaron más cajas para obtener cajas sin ningún otro hongo que pudiera afectar la identificación molecular.

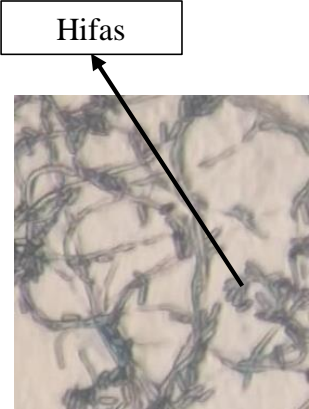
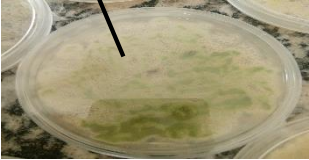
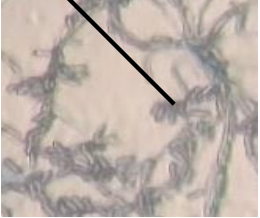

Bajo el microscopio, se observan características como hifas entrelazadas entre sí y ramificadas, las cuales forman una bolsa y se presentan separadas o libres, aspectos que son típicos de *Metarhizium spp.*, tal como se ha indicado en Gato-Cárdenas et al., (2017) quien menciona que las colonias presentan una estructura similar al algodón, de color blanco, que se transforma en tonos verde grisáceo durante la esporulación, formando halos o anillos concéntricos. Estas estructuras, conocidas como conidióforos, se observan más concentradas en el centro. Las colonias tienen un borde regular y algodonoso, con una notable presencia de micelio aéreo.

De acuerdo a (Ramírez et al., 2022) las colonias en PDA tienen un diámetro de 7,8 cm y presentan una textura algodonosa y color blanco, que cambia a un tono verde olivo intenso durante la esporulación. La apariencia es costrosa y se adhiere al medio de cultivo. Esporulación en anillos concéntricos. Colonia con borde regular, algodonoso con abundante micelio aéreo.

10.4. Identificación Morfología de *Metarhizium spp.*










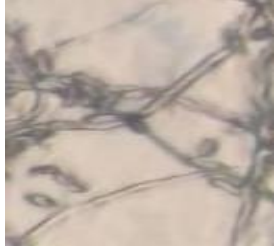


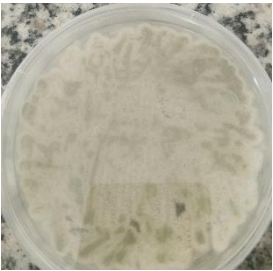



Este hongo entomopatógeno tiene un uso extendido en la agricultura para combatir insectos nocivos, dado que infecta y elimina diversas especies de insectos, incluyendo larvas de ciertos insectos considerados plagas (Hajek & St. Leger, 1994).

Tabla 8: Características morfológicas de *Metarhizium spp.* vistas a través del microscopio

Partes	Descripción	Fotografía
Hifas	<p>Diámetro: El diámetro de las hifas individuales de <i>Metarhizium spp.</i> puede variar típicamente entre 2 y 5 micrómetros. Sin embargo, en algunas condiciones y especies, este diámetro puede ser mayor o menor.</p> <p>Longitud: La longitud de las hifas puede variar considerablemente. En condiciones de crecimiento óptimas, las hifas pueden crecer desde unos pocos micrómetros hasta varios centímetros de longitud.</p>	
Micelio	El diámetro de las hifas individuales del micelio puede variar entre 2 y 5 micrómetros, mientras que la longitud de las hifas puede extenderse desde unos pocos micrómetros hasta varios centímetros, dependiendo de las condiciones de crecimiento.	
Conidióforos	Los conidióforos pueden tener una longitud que va desde 50 hasta 200 micrómetros, y un diámetro de alrededor de 2 a 5 micrómetros, nuevamente dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento.	
Conidias	Las conidias típicamente tienen una longitud que oscila entre 5 y 10 micrómetros, y un diámetro de 2 a 5 micrómetros. Estas medidas también pueden variar según la especie y las condiciones ambientales.	

Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024)

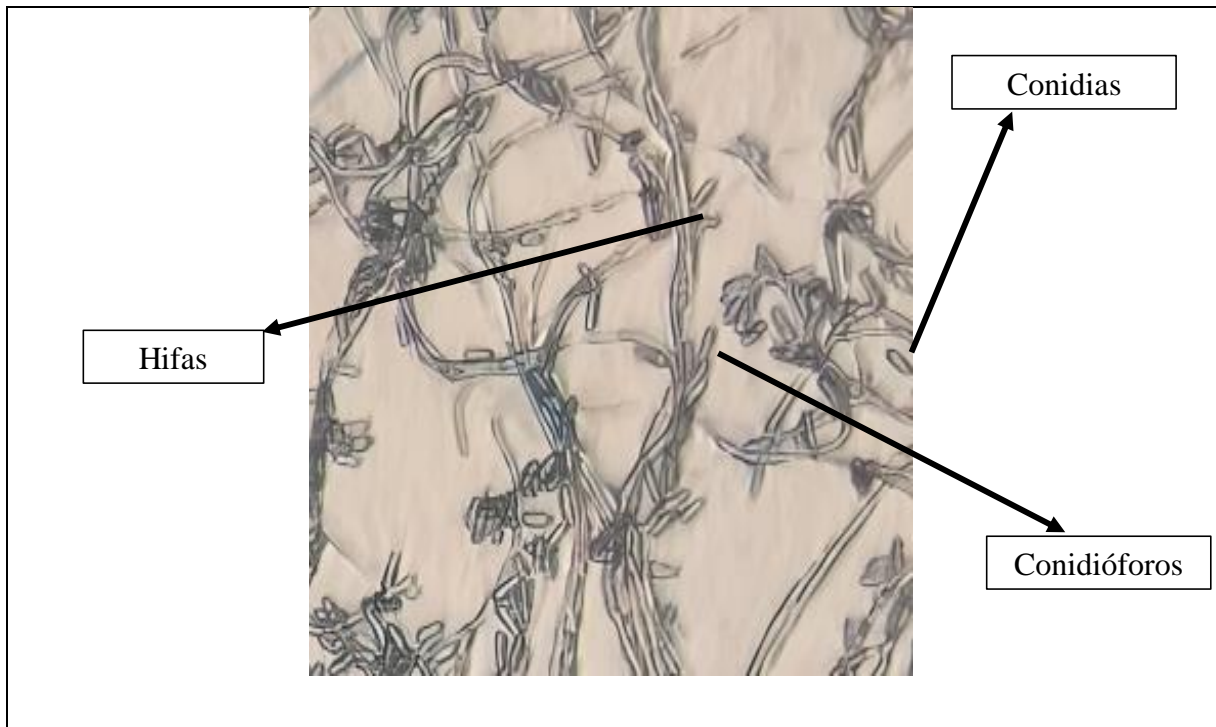
Tabla 9: Visualización de *Metarhizium spp.* en el microscopio

<p>A</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre A.</p>	<p>B</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre B.</p>
<p>C</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre C.</p>	<p>D</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre D.</p>
<p>E</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre E.</p>	<p>F</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre F.</p>
<p>G</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre G.</p>	<p>H</p> 	 <p>Ilustración microscópica de la caja Petri con el nombre H.</p>

Como resultado de las observaciones detalladas del hongo *Metarhizium spp.*, se destaca su compleja morfología y desarrollo. Se evidencia una red intrincada de hifas ramificadas y delgadas que forman una estructura tridimensional en el sustrato, típica de este género. Las hifas, con diámetros que oscilan entre 1 y 5 micrómetros (μm) y longitudes variables, constituyen la base de su crecimiento. Las conidias, generalmente unicelulares y con diámetros que oscilan entre 2-10 μm , completan el ciclo reproductivo del hongo. Es importante destacar que la morfología y las dimensiones de estas estructuras pueden variar según la especie de *Metarhizium* y las condiciones ambientales, como la humedad y la temperatura.

Después de siete días de crecimiento, todas las colonias se volvieron verdes, alcanzando así su punto de maduración para la esporulación. De acuerdo con Aguilera-Cogley, Jaén-Torrijos, Ávila-Rodríguez, Herrera-Vásquez, Jaén-Sanjur, Barba-Alvarado, et al., (2020), los aislados naturales de *Metarhizium spp.*, obtenidos de hongos entomopatógenos, presentaron colonias inicialmente blancas que luego adquirieron un tono verde claro. Según Castro López et al., (2019) describe que el crecimiento del hongo es inicialmente blanco y algodonoso en su juventud, pero adquiere una coloración verde oscura a medida que madura. Las características incluyen hifas hialinas y septadas, con conidióforos cortos, fialides solitarias o agrupadas en pares o manojos, de las cuales se forman conidios en cadena. Estos conidios son cilíndricos, unicelulares, con longitudes de 3,5 a 8 μm y anchos de 1.5-2.5 μm , y pueden ser hialinos o ligeramente pigmentados, con estomas carnosos. Según lo mencionado por Murillo-Cuevas et al., (2020) describe que el micelio del hongo tiene un color verde oliva y presenta hifas lisas y septadas, con conidióforos en montículos bajos, cubiertos por conidios, erectos, ramificados y agrupados de forma estrecha o ligeramente, formando una capa esporulante.

Imagen 5: Morfología de *Metarhizium spp.*



Elaborado por: (Guamantaqui Edison ,2024)

Durante un período de siete días desde la inoculación de *Metarhizium spp.* en el medio de cultivo PDA, las hifas emergen como los primeros elementos morfológicos distinguibles. Estos filamentos delgados y ramificados forman una red micelial con un patrón de crecimiento radial desde el punto de inoculación, estando divididos por septos que compartimentan el citoplasma. A medida que avanza el proceso, las conidioforas toman forma, presentándose como estructuras que brindan soporte a los conidios. Estas pueden ser simples o ramificadas, surgiendo directamente del micelio o formando estructuras más complejas. Finalmente, los conidios, esporas asexuales, se forman en los conidióforos alargados y cilíndricos, dispuestos en cadenas o agrupaciones. A lo largo de este período de observación, se logró observar un crecimiento gradual de las hifas, seguido por la aparición de las conidioforas y, finalmente, la formación progresiva de conidios, elementos esenciales para la reproducción y dispersión efectiva de *Metarhizium spp.*

Según Humber, (2012) las especies y variedades del hongo *Metarhizium* presentan una amplia diversidad morfológica, reflejada en las características de sus conidios. Por ejemplo, *Metarhizium anisopliae* exhibe conidios cilíndricos de alrededor de 9 micrómetros de longitud, mientras que *M. flavoviride var. minus* presenta conidios más pequeños, ovoides y de

aproximadamente 4-6 micrómetros de longitud. Además de diferencias en tamaño y forma, estas variedades muestran una variedad de colores en sus conidios, desde tonalidades verdes hasta marrones y amarillos. Estas características morfológicas distintivas, combinadas con su amplia distribución geográfica y sus preferencias de hospedaje, permiten la identificación y clasificación de estas especies y variedades dentro del género *Metarhizium*.

10.5. Identificación molecular de *Metarhizium spp.*

10.5.1. Interpretación del análisis molecular

Se realizó el análisis molecular de una muestra del hongo *Metarhizium spp.* enviada a al laboratorio BIOHACK UIO Community Lab. denominada “MUESTRA A IDENTIFICAR DE METARIZHIUM ”, cultivada en PDA.

La identificación a nivel especie se realizó a través de metagenómica de amplicones para la identificación molecular del hongo. Se logro amplificar la región centrada en ITS_ITS2. Se empleando los primers ITS86F (GTGAATCATCGAATCTTTGAA) y ITS4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Extracción del ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo en el al laboratorio BIOHACK UIO Community Lab de acuerdo a protocolos utilizando el kit comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System, diseñado para tejidos y células bacterianas/fúngicas, con un protocolo modificado para obtener el ADN total de la muestra.

Posteriormente, se cuantificó el ADN utilizando un espectrofotómetro de microplacas UV/Vis, y se evaluaron los parámetros de calidad del ADN, tales como A260/A280 nm y A260/A230 nm.

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que la relación A260/A280 fue de 1.63 y la relación A260/A230 fue de 1.86, lo cual indica que la concentración de ADN se encuentra dentro de los parámetros adecuados para realizar el análisis molecular . Estos valores sugieren una concentración óptima de ADN en relación con el ARN y una baja presencia de solventes utilizados durante la extracción del material genético. Esta observación es consistente con los criterios definidos por Gavilanes et al. (2021), quienes establecieron rangos específicos de absorbancia para evaluar la pureza del ADN.

Según Gavilanes et al., (2021) , la pureza del ADN se evalúa meticulosamente utilizando las relaciones de absorbancia A260/A280 nm y A260/A230 nm. Se considera que los valores entre 1.8 y 2.0 en la relación A260/A280 nm indican la presencia de ADN en estado puro, mientras que una relación mayor a 1.6 se considera aceptable, aunque podría sugerir la presencia de contaminantes como trazas de fenol y proteínas. Además, valores superiores a 2.1 podrían indicar la presencia de ARN en la muestra. En cuanto a la relación A260/A230 nm, se establece que los valores óptimos oscilan entre 1.8 y 2.2 en relación con la pureza del ADN, dado que valores inferiores podrían indicar la presencia de polisacáridos y polifenoles.

En conjunto, estos resultados y criterios de evaluación proporcionan una base sólida para determinar la pureza del ADN extraído en el estudio. La meticulosa evaluación de la relación de absorbancia A260/A280 nm y A260/A230 nm permite identificar posibles contaminantes y garantizar que el ADN obtenido sea adecuado para su uso en análisis posteriores, lo que contribuye a la fiabilidad y validez de los resultados obtenidos en la investigación genética.

Amplificación del ADN

Con el objetivo de identificar molecularmente las cepas reactivadas de *Metarhizium spp.* almacenadas en el laboratorio de la carrera de agronomía, se amplificaron secuencias internas transcritas (ITS) mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para amplificar regiones de los genes ribosomales. Estas secuencias son ampliamente utilizadas en estudios taxonómicos debido a su variabilidad. Las mutaciones que ocurren en las ITS no tienen efectos en el desarrollo del organismo, lo que facilita la caracterización basada en variaciones en tamaño y secuencia.

Para la amplificación de las secuencias espaciadoras internas (ITS) del ADN ribosomal, se utilizaron los iniciadores ITS1 (5'GTGAATCATCGAATCTTTGAA 3') e ITS4

(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Estos iniciadores permiten la amplificación de un fragmento de ADN que incluye las regiones ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S. El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research Inc PTC-200, siguiendo condiciones específicas que incluyeron una denaturación inicial, ciclos de denaturación, alineamiento y extensión, y una extensión final.

Posteriormente, para la preparación de los datos, se utilizó el software Cutadapt para eliminar los cebadores (primers) y sus coincidencias (matches) de las secuencias analizadas. ¡La asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos UNITE![:https://doi.org/10.15156/BIO/2938067](https://doi.org/10.15156/BIO/2938067) . Todos estos pasos fueron realizados con atención

meticulosa para garantizar la calidad y precisión de los resultados obtenidos en el análisis de la diversidad genética de las cepas de *Metarhizium spp.* los mismos resultados encontró Rosillo G. et al., (2018) para evaluar la diversidad genética de los aislamientos de *Metarhizium spp.* en la zona cafetera central colombiana, se implementó la técnica de PCR con el propósito de amplificar las Secuencias Internas Transcritas (ITS) del ADN ribosomal. Las ITS son fragmentos altamente variables y comúnmente utilizados en análisis taxonómicos. Los iniciadores ITS1 e ITS4 fueron empleados para amplificar un segmento de ADN que comprende las regiones ITS1, ITS2 y el gen ribosomal 5.8S.

Los análisis moleculares realizados en BIOHACK Community lab se iniciaron con la amplificación de las regiones anteriormente descritas a través de reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos de 0,5 mL con los componentes estándar para PCR, siguiendo las condiciones de temperatura específicas en un termociclador. Posteriormente, los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la visualización facilitada por la presencia de bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó utilizando un marcador de peso molecular como referencia. Este enfoque metodológico permitió explorar la variabilidad genética de los aislamientos de *Metarhizium spp.* de manera eficaz y precisa, generando información valiosa para los análisis taxonómicos y de caracterización genética de estos organismos, como señala Gavilanes et al., (2021).

Los resultados revelaron que todas las lecturas procesadas pasaron el control de calidad, y se observó la presencia del género *Metarhizium* en un 100% de las lecturas. Además, la asignación taxonómica reveló la presencia exclusiva de la especie *Metarhizium anisopliae* en un 100% de las lecturas.

El análisis de identificación molecular permitió identificar la presencia de una única cepa purificada perteneciente al género y especie *Metarhizium anisopliae* en la muestra analizada, lo que sugiere un alto grado de pureza y una identificación específica de la especie objetivo.

11. Presupuesto del proyecto

Tabla 10: Costos del proyecto de investigación

Materiales	Cantidad	Precio	Total
Cajas Petri plástico pequeños	120	\$0,40	\$48,00
Medio de cultivo (PDA).	1	\$90,00	\$90,00
Mechero de alcohol.	1	\$5,00	\$5,00
Papel absorbente.	3	\$2,75	\$8,25
Guantes quirúrgicos.	una caja	\$3,00	\$3,00
Para film.	una caja	\$70,00	\$70,00
Alcohol 70%	1	\$10,00	\$10,00
Alcohol 96%	1	\$10,00	\$10,00
Tijera	1	\$0,50	\$0,50
Marcador	1	\$1,00	\$1,00
Agua destilada	2 galones	\$5,00	\$5,00
Papel aluminio	2	\$2,75	\$2,75
Cajas Petri cristal grande	60	\$2,50	\$150,00
Refrigerador	1	\$300,00	\$300,00
Estuche de decisión	1	\$16,00	\$16,00
Asa de siembra	1	\$20,00	\$20,00
Hisopos	una caja	\$2,00	\$2,00
Palillos	una caja	\$0,35	\$0,35
Plástico film.	un rollo	\$5,00	\$5,00
		Total	\$746,85

PRESUPUESTO COMIDA Y TRASPORTE PARA IR A AL LABORATORIO				
Actividades	Días	Ida	Vuelta	Total
Reactivación y purificación	40	\$ 1,50	\$ 1,50	\$ 120,00
	Días	Café	Almuerzo	
Comida	40	\$ 2,25	\$ 2,25	\$ 180,00
			Total	\$ 300,00

ANÁLISIS DEL HONGO			
HONGO	UNIDAD	PRECIO	TOTAL
<i>Metarizhium spp.</i>	1	\$125,00	\$125,00
		Total	\$125,00

Presupuesto total de la investigación	\$ 1.171,85
---------------------------------------	--------------------

12. IMPACTOS (SOCIALES, AMBIENTALES Y ECONÓMICOS)

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

12.1. Impacto social

Las cepas madres de *Metarhizium spp* que se disponía en el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía, se confirmó que es *Metarhizium anisopliae* y puede ser utilizado como una alternativa de controles biológicos.

12.2. Impacto ambiental

El hongo entomopatógeno conocido como *Metarhizium anisopliae* se centra en su capacidad para controlar de manera efectiva y selectiva las poblaciones de insectos plaga. Este hongo entomopatógeno ofrece beneficios significativos para la agricultura al reducir la necesidad de utilizar pesticidas químicos, lo que disminuye la contaminación ambiental y promueve sistemas agrícolas más sostenibles, al ser específico para ciertas especies de insectos, contribuye a la conservación del medio ambiente y preservar la biodiversidad local.

12.3. Impacto económico

El uso *Metarhizium anisopliae* como posible controlador dará una gran ventaja a los agricultores, el manejo de los cultivos será completamente orgánico, el agricultor tendrá más oportunidad de comercio de productos orgánicos para la industria.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Durante el estudio, se observó que las cajas multiplicadas con hisopos no mostraron presencia de *Aspergillus*, uno de los hongos que comúnmente contaminan los cultivos. Esta observación sugiere que el método de multiplicación utilizando hisopos podría considerarse altamente estéril en comparación con otros métodos empleados previamente.
- Mediante la observación a través del microscopio, se verificó la morfología del hongo *Metarhizium spp*. Además, se realizó un análisis de identificación molecular enviado a BIOHACK UIO, lo que confirmó que se trataba de *Metarhizium anisopliae*.
- Los costos de reactivación, purificación y análisis de identificación molecular realizados en el laboratorio (Biohack UIO Community Lab) resultaron ser de 1.171,85 dólares , dicha inversión no es benéfica para un pequeño productor .

Recomendaciones

- Se recomienda la implementación de protocolos rigurosos de esterilización y monitoreo para garantizar la integridad de las muestras de *Metarhizium spp.* Esto implica el uso de técnicas y procedimientos estandarizados para la esterilización de equipos, medios de cultivo y áreas de trabajo, así como la realización de controles regulares para detectar posibles contaminaciones. Estos protocolos son fundamentales para mantener la pureza y la viabilidad de las muestras, lo que asegura la validez y la confiabilidad de los resultados obtenidos en investigaciones y aplicaciones prácticas.
- Se recomienda establecer relaciones colaborativas con asociaciones especializadas en la identificación de hongos. Estas asociaciones pueden proporcionar asistencia experta para determinar el género y la especie de cualquier hongo obtenido. La colaboración con estas organizaciones puede implicar la participación en talleres, cursos de capacitación o la consulta directa con micólogos experimentados. Estas relaciones pueden ser invaluable para garantizar una identificación precisa y confiable de los hongos, lo que es crucial para la investigación científica, la gestión de plagas y otras aplicaciones relacionadas con la micología.
- Se sugiere explorar y desarrollar métodos alternativos más económicos y accesibles para la reactivación, purificación y análisis de identificación de *Metarhizium spp.*, especialmente diseñados para agricultores y pequeñas comunidades agrícolas. Esto podría incluir la creación de kits de reactivación y purificación asequibles, así como el fomento de colaboraciones con laboratorios locales o instituciones académicas para reducir los costos de análisis de identificación masiva.
- Se sugiere explorar la viabilidad de ofrecer el hongo *Metarhizium anisopliae* ya en sustrato como una alternativa más económica y accesible para agricultores y pequeñas comunidades agrícolas. Esto podría implicar el desarrollo de métodos de producción y distribución que permitan la entrega del hongo en un estado listo para usar, reduciendo así la necesidad de reactivación y purificación por parte del agricultor. Además, se podría considerar establecer colaboraciones con laboratorios locales o instituciones académicas para facilitar la producción y distribución del hongo ya en sustrato, lo que podría ayudar a reducir los costos asociados para los agricultores.

14. BIBLIOGRAFÍAS

- Acuña Jiménez, M., García Gutiérrez, C., Rosas García, N. M., López Meyer, M., & Saínz Hernández, J. C. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (Fabricius). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 31(3), 219-226.
- Aguilera-Cogley, V. A., Jaén-Torrijos, M., Ávila-Rodríguez, L. Y., Herrera-Vásquez, J. Á., Jaén-Sanjur, J. N., & Barba-Alvarado, A. A. (2020). Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. *Idesia (Arica)*, 38(1), 59-65. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000100059>
- Aguilera-Cogley, V. A., Jaén-Torrijos, M., Ávila-Rodríguez, L. Y., Herrera-Vásquez, J. Á., Jaén-Sanjur, J. N., Barba-Alvarado, A. A., Aguilera-Cogley, V. A., Jaén-Torrijos, M., Ávila-Rodríguez, L. Y., Herrera-Vásquez, J. Á., Jaén-Sanjur, J. N., & Barba-Alvarado, A. A. (2020). Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. *Idesia (Arica)*, 38(1), 59-65. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000100059>
- Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., Angel-Cuapio, A., Alcantara-Vargas, E., Espitia-López, J., Garza-López, P. M., & Angel-Cuapio, A. (2020). Producción y calidad de conidios 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>
- Asela M. del Puerto Rodríguez, Susana Suárez Tamayo, Daniel E. Palacio, Estrada, & del Puerto Rodríguez, Asela M.; Suárez Tamayo, Susana; Palacio Estrada, Daniel E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *diciembre, 2014*, 52(3), 387.

- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Vayias, B. J., Tsakiri, J. B., Mikeli, N. H., Meletsis, C. M., & Tomanović, Ž. (2008). Persistencia y eficacia de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) y tierra de diatomeas contra *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) y *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) en trigo y maíz. *Crop Protection*, 27(10), 1303-1311.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.03.004>
- Basulto, M. E. C., Sánchez, E. R., Cupul, W. C., Gómez, H. B., Ramírez, A. R., & Núñez, E. H. (2022). Potencial de hongos entomopatógenos para el manejo de la araña roja. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 26(Especial), 7-8.
<https://doi.org/10.53897/RevAIA.22.26.13>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*.
- Castro López, M. A., & Martínez Osorio, J. W. (2019). COMPATIBILIDAD DE Beauveria bassiana Y Metarhizium anisopliae CON Chrysoperla externa DEPREDADOR DE Trialeurodes vaporariorum. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 38-48. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000104>
- Castro López, M. A., Martínez Osorio, J. W., Castro López, M. A., & Martínez Osorio, J. W. (2019). COMPATIBILIDAD DE Beauveria bassiana Y Metarhizium anisopliae CON Chrysoperla externa DEPREDADOR DE Trialeurodes vaporariorum. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 38-48. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000104>
- Contreras Arias, L. J., Medina, H., Bustillo, A., Sarria, G., & Morales Rodriguez, A. (2021). *Morfología de aislamientos de Metarhizium aislados de insectos plaga en palma*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28362.08647>
- Correa, O. (2013). *LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU ROL INDISCUTIDO EN*

LA NUTRICIÓN VEGETAL.

- Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya Molina, L. X., Sandoval Cancino, G., Santos Villalobos, S. de los, Rojas Anaya, E., Chávez Díaz, I. F., Ruíz Ramírez, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Zelaya Molina, L. X., Sandoval Cancino, G., Santos Villalobos, S. de los, Rojas Anaya, E., Chávez Díaz, I. F., & Ruíz Ramírez, S. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: Consideraciones y retos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *12*(5), 899-913.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>
- De la Fuente-Salcido, N. M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., García Pérez, A. P., De la Fuente-Salcido, N. M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *46*(2), 7-16.
- Falvo, M. L. (2019). *Selección de aislamientos nativos de Metarhizium anisopliae como potenciales agentes de control biológico de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae)* [Doctor en Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata].
<https://doi.org/10.35537/10915/73538>
- Gato-Cárdenas, Y., Márquez-Gutiérrez, M. E., Baró-Robaina, Y., & Calle-Osorno, J. de J. (2017). Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo *Metarhizium anisopliae* con acción entomopatogénica contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Actualidades Biológicas*, *39*(106), 71-78.
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a07>
- Gavilanes, D., Ordóñez, E., & Parra R, G. (2021). *Isolation and molecular characterization of phytoplankton strains obtained in Engabao, Guayas-Ecuador*. *15*, 259-277.
<https://doi.org/10.53591/cna.v15i2.1396>

- Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293-322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Hernandez, F., García-Pacheco, L., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa, B., Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D., & Díaz-Sánchez, E. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10, 155-166. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>
- Hernández-Rosas, F., García-Pacheco, L. A., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa-Sandoval, B., Salinas Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D. Ma., & Díaz-Sánchez, E. L. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 22, 155-166.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>
- Humber, R. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 151-187). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>
- Intriago, R., & Amézcuca, R. G. (2016). AGROECOLOGÍA EN EL ECUADOR. PROCESO HISTÓRICO, LOGROS Y DESAFÍOS. *Agroecología*, 11(2), Article 2.
- Luz, C., Rocha, L. F. N., Montalva, C., Souza, D. A., Botelho, A. B. R. Z., Lopes, R. B., Faria, M., & Delalibera, I. (2019). *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), un nuevo miembro del clado PARB en el complejo *Metarhizium anisopliae* de América Latina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 166, 107216.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107216>
- Manzi, L. V., & Mayz, J. C. (2003). Valorando los microorganismos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 85-88.
- Matabanchoy Solarte, J. A., Bustillo Pardey, A. E., Castro Valderrama, U., Mesa Cobo, N. C.,

- & Moreno Gil, C. A. (2012). Eficacia de *Metarhizium anisopliae* para controlar *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae), en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 177-181.
- Murillo-Cuevas, F. D., Cabrera-Mireles, H., Adame-García, J., Fernández-Viveros, J. A., Narváez, J. V., López-Morales, V., Vázquez-Hernández, A., & Meneses-Márquez, I. (2020). Evaluación de insecticidas biorracionales en el control de mosca blanca (Hemiptera: Aleyrodidae) en la producción de hortalizas//Evaluation of biorational insecticides for whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) control in vegetables production. *Biotechnia*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v22i1.1123>
- Negrete Franklin. (2023). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE (Metarhizium spp) DE TRES ZONAS DEL SUBTRÓPICO DEL ECUADOR (COTOPAXI Y PICHINCHA) DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR (Saccharum officinarum L)*. <https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/10709/1/PC-002779.pdf>
- Obando B., J. A., Bustillo P., A. E., Castro V., U., & Mesa C., N. C. (2013). Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 26-33.
- Pavone, D. (2021, septiembre 3). *Metarhizium spp*: Hongo endófito de plantas y patógeno de insectos plaga. *TECNOVITA*. <https://tecnovitaca.com/metarhizium-endofito-patogeno-insectos/>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Ramírez, M., Lezama-Gutiérrez, R., Rangel, J. C., Chan-Cupul, W., Buenrostro-Nava, M., & Manzo-Sánchez, G. (2022). Diversidad Genética de *Metarhizium anisopliae* aislados de insectos y agroecosistemas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25, 1-8. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3860>

- Reyes, I., & Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento Del maíz (zea mays l.) Con azotobacter spp. *Bioagro*, 19(3), 117-126.
- Rodríguez S., M., Gerding P., M., & France, A. (2006). Selección de Aislamientos de Hongos Entomopatógenos para el Control de Huevos de la Polilla del Tomate, Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultura Técnica*, 66(2), 151-158.
<https://doi.org/10.4067/S0365-28072006000200005>
- Rodríguez-Rodríguez, J. C., Ayala-Zermeño, M. A., Neri-Luna, C., Rodríguez-Vélez, B., Gallou, A., Castruita-Domínguez, J. P., Rodríguez-Rodríguez, J. C., Ayala-Zermeño, M. A., Neri-Luna, C., Rodríguez-Vélez, B., Gallou, A., & Castruita-Domínguez, J. P. (2023). Presencia natural de *Metarhizium* en suelos agrícolas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en Colima, México. *Manglar*, 20(1), 69-76.
<https://doi.org/10.57188/manglar.2023.008>
- Rosillo G., A. G., Marin M., P., Galeano V., N. F., & Gaitan B., A. L. (2018). *Diversidad genética de Metarhizium spp de la zona cafetera colombiana*.
<https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/1092>
- Salamone, G. de, & Eugenia, I. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista argentina de microbiología*, 43(1), 1-3.
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2021). Organismos benéficos en cultivos agrícolas: Hacia una producción de alimentos sanos e inocuos en respuesta a COVID-19 y futuras sindemias. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(SPE), 261-281.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2021-13>
- Silva, R. R. D., Vargas-Flores, J., Sánchez-Choy, J., Oliva-Paredes, R., Alarcón-Castillo, T., Panduro, P. P. V., Silva, R. R. D., Vargas-Flores, J., Sánchez-Choy, J., Oliva-Paredes, R., Alarcón-Castillo, T., & Panduro, P. P. V. (2020). *Beauveria bassiana* y

Metarhizium anisopliae como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 419-426.

<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.14>

Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30, 73-80.

Valle, S., Carrera, K., Alemán, R., Caicedo, W., Valle, S., Carrera, K., Alemán, R., & Caicedo, W. (2021). Caracterización de aislamientos nativos de Metarhizium spp. Para el control de Mahanarva andigena en el cultivar de caña de azúcar POJ93 en la Amazonia ecuatoriana. *Idesia (Arica)*, 39(1), 69-75. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292021000100069>

Valle-Ramírez, S. B., Torres-Gutiérrez, R., Caicedo-Quinche, W. O., Abril-Saltos, R. V., & Sucoshañay-Villalba, D. J. (2022). Aislamiento y caracterización de Metarhizium spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra Mahanarva andigena (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(1), Article 1. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2361

Vega, F., Meyling, N., Luangsa-Ard, J., & Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. En *Fungal entomopathogens* (pp. 171-220). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., Perdomo-Quispe, C. E., Pincay-Verdezoto, A. K., Báez-Cevallos, F. J., Vásquez-Castillo, W. A., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.

Zuccarelli, P. R. (2019, octubre 18). *Fungicidas: Impacto en la Salud y el Medio Ambiente*.

TSI Group - Tecnosoluciones Integrales. <https://tecnosolucionescr.net/blog/145->

[fungicidas-impacto-en-la-salud-y-el-medio-ambiente](https://tecnosolucionescr.net/blog/145-fungicidas-impacto-en-la-salud-y-el-medio-ambiente)