



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

---

**“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE MANEJO DE BIOCONTROLADORES (*Metarhizium anisopliae*). EN SU CAPTURA, AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN SALACHE-CEYPSA 2021”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Ingeniera  
Agrónoma

---

**Autor:**

Negrete Cueva Denisse Nathalia.

**Tutor:**

Chancusig Espín Edwin Marcelo. Ing. Ph.D.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Agosto 2021**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Denisse Nathalia Negrete Cueva, con cédula de ciudadanía No. 1752954535, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: “Revisión bibliográfica de protocolos de manejo de biocontroladores (*metarhizium anisopliae*). en su captura, aislamiento y propagación Salache-Ceypsa 2021”, siendo el Ingeniero. Ph.D. Chancusig Espín Edwin Marcelo. 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, 13 de Agosto del 2021

Denisse Nathalia Negrete Cueva  
Estudiante  
C.C: 175295453-5

Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig Espín.  
Docente Tutor  
CC: 050114883-7

## 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 **NEGRETE CUEVA DENISSE NATHALIA**, identificada con cédula de ciudadanía No. **1752954535** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Ingeniería Agronómica titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Revisión bibliográfica de protocolos de manejo de biocontroladores (*metarhizium anisopliae*). en su

captura, aislamiento y propagación Salache-CEYPSA 2021”, 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 2016 - Marzo 2017

Finalización de la carrera: Abril 2021 – Agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 20 de mayo del 2021

Tutor: Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig Espín.

Tema: “Revisión bibliográfica de protocolos de manejo de biocontroladores (*metarhizium anisopliae*). en su captura, aislamiento y propagación Salache-CEYPSA 2021”

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

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

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

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

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

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

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

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

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

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

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

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 13 días del mes de agosto del 2021.

Denisse Nathalia Negrete Cueva  
**LA CEDENTE**

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez  
**LA CESIONARIA**

## AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del **Trabajo de Investigación** con el título:

**“REVISIÓN BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS DE MANEJO DE BIOCONTOLADORES (*Metarhizium anisopliae*). EN SU CAPTURA, AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN SALACHE-CEYPSA 2021”** de Negrete Cueva Denisse Nathalia de la carrera de Ingeniería Agronómica, 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, 13 de agosto del 2021

Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig Espín

**DOCENTE TUTOR**

CC: 050114883-7

## AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de tribunal de lectores, aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por la Facultad de Ciencia Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante Denisse Nathalia Negrete Cueva, con el título de Proyecto de Investigación: **“REVISIÓN BIBLIOGRAFICA DE PROTOCOLOS DE MANEJO DE BIOCONTOLADORES (*Metarhizium anisopliae*). EN SU CAPTURA, AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN SALACHE-CEYPSA 2021”**. ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometidos al actor de sustentación de proyecto.

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

Latacunga, 13 de agosto del 2021

Lector 1 (Presidente)

Ing. Mg. Klever Quimbiulco Sanchez

CC:1709561102

Lector 2

Ing. M.Sc. Giovanna Parra Gallardo.

CC:1802267037

Lector 3

Ing. Mg. David Carrera Molina

C.C:0501974703

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por concederme salud, fortaleza y sabiduría a lo largo de mi vida y guiarme en el camino. A mi padre Cristóbal Negrete por el apoyo incondicional, esfuerzo y dedicación que me ha brindado para culminar mis estudios. A mis abuelitos Alfonso y María por brindarme su cariño y su bendición. A la familia. Nieto Jara por brindarme su apoyo. A mis hijos Aimee y Sebastián por ser mi pilar fundamental y motivarme a cumplir mis metas. A la Universidad Técnica de Cotopaxi en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a cada uno de los docentes que compartieron sus conocimientos para mi vida profesional. Al Ing. Mg. Edwin Marcelo Chancusig Espín. PhD por brindarme su apoyo y conocimiento para la elaboración de mi Proyecto de Investigación

**Nathalia Negrete**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento importante en mi vida profesional.

A mi padre por ser el pilar fundamental y por demostrarme siempre su amor, apoyo y dedicación incondicional. A mi abuelita que ahora no está físicamente, pero sé que desde el cielo me estás dando tus bendiciones para llegar a cumplir las metas propuestas. Gracias por haber estado conmigo en los momentos más importantes de mi vida, por ser el ejemplo de una mujer trabajadora y amorosa con toda tu familia. Gracias por tu amor por tu paciencia y por enseñarme a esforzarme y seguir tu ejemplo.

Siempre estarás presente en mi mente y mi corazón.

**Nathalia Negrete**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO:** “Revisión bibliográfica de protocolos de manejo de biocontroladores (*Metarhizium anisopliae*). en su captura, aislamiento y propagación Salache-CEYPSA 2021”

**Autor:** Negrete Cueva Denisse Nathalia

### RESUMEN

El microbiota del suelo está conformado por microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos y animales, que contribuyen al funcionamiento de los ecosistemas, ya que de ellos depende el mantenimiento de la estructura del suelo, la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad y reciclaje de nutrientes.

Esta investigación se centró en recopilar información adecuada y puntual para capturar, aislar y reproducir al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* haciendo posible futuras investigaciones sobre este organismo benéfico. Se usó el método de revisiones sistemáticas para determinar los mejores procedimientos tanto en laboratorio como en el campo. Mediante la recopilación de 330 fuentes bibliográficas descargadas de Google scholar y analizadas individualmente para la obtención de la información más idónea para la investigación. Como resultado se obtuvo un grupo constituido de 313 estudios para ser analizados y poder extraer los mejores protocolos de la bibliografía encontrada.

Se espera que la información obtenida en esta investigación contribuya a futuras investigaciones en la aplicación y captura de cepas nativas de hongos entomopatógenos de CEYSA.

**Palabras claves:** *Metarhizium anisopliae*, ecología, microbiología, captura, aislamiento, propagación

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

**THEME:** "Bibliographic review of protocols for handling biocontrolators (*Metarhizium anisopliae*). in their capture, isolation and propagation Salache-CEYPSA 2021"

**AUTHOR:** Negrete Cueva Denisse Nathalia

**ABSTRACT**

The soil microbiota is made up of microorganisms such as bacteria, fungi, protozoa and animals, which contribute to the functioning of ecosystems, since the maintenance of soil structure, the decomposition of organic matter and the availability and recycling of nutrients depend on them.

This research focused on gathering adequate and timely information to capture, isolate and reproduce the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* making possible future research on this beneficial organism. The systematic review method was used to determine the best procedures both in the laboratory and in the field. Through the compilation of 330 bibliographic sources downloaded from Google scholar and analyzed individually to obtain the most suitable information for the research. As a result, a group of 313 studies was obtained to be analyzed in order to extract the best protocols from the bibliography found.

It is hoped that the information obtained in this research will contribute to future research in the application and capture of native strains of entomopathogenic fungi from CEYSA.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, ecology, microbiology, trapping, isolation, propagation

## INDICE DE CONTENIDO

### Contenido

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR .....	ii
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO .....	vii
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
INDICE DE CONTENIDO .....	xi
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
INDICES DE CUADROS .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS .....	3
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. Objetivo General:.....	4
5.2. Objetivos Específicos: .....	4
6. Actividades y sistema de tareas en relación con los objetivos planteados. ....	4
7. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
7.1. Microorganismos del suelo .....	5
7.2. Distribución de los microorganismos del suelo .....	6
7.3. Diversidad de microorganismos del suelo .....	7
7.4. Factores que influyen en la diversidad de microorganismos en el suelo .....	7
7.5. Microorganismos Benéficos .....	8
7.6. Aplicación de los Microorganismos Benéficos:.....	8
7.7. Funciones de los Microorganismos Benéficos .....	8
7.8. Importancia de los microorganismos benéficos .....	8
7.9. Ecología de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	9
7.10. Características de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10

7.11. Características del Hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10
7.12. Modo de Acción de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	11
7.13. Especies sensibles al Hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	11
7.14. <i>M. anisopliae</i> en combinación con <i>B. bassiana</i> .....	11
8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS.....	11
9. METODOLOGIA.....	11
9.1. Estrategia de búsqueda .....	11
9.2. Definición de temas.....	12
9.3. Operadores booleanos .....	12
9.4. Estrategia de búsqueda en base de datos.....	13
9.5. Gestión bibliográfica.....	14
9.5.1. Limpieza de base de datos .....	14
9.5.2. Codificación de base de datos .....	15
9.6. Procedimiento .....	15
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	16
10.1. Revisión Bibliográfica .....	16
10.1.1. Documentación .....	16
10.2. Distribución de la información .....	17
10.3. Años con mayor generación de investigaciones en torno a <i>M. anisopliae</i> . .....	18
10.4. Idiomas de documentos Bibliografías.....	18
10.5. Protocolos de captura, aislamiento y propagación.....	19
10.6. Países con mayor generación de artículos: 2000 2021 .....	20
10.7. Documentos últimos 10 años.....	20
10.8. Métodos de captura.....	20
10.8.1. Método de dilución en el suelo.....	21
10.8.2. Captura de los insectos micóticos .....	21
10.8.3. Método del cebo .....	21
10.9 Métodos de propagación .....	21
10.9.1. Medios de cultivo de laboratorio .....	21
10.9.2. Medios de cultivo y composición: .....	22
10.9.2.1. Agua agar.....	22
10.9.2.2. Papa dextrosa agar (PDA) .....	22
10.9.2.3. Fitolevadura.....	23

10.9.2.4. Sabouraud .....	23
10.9.2.5. Miel peptona agar.....	23
10.9.3. Medios líquidos. ....	24
10.9.4. Aislamiento.....	24
10.10. Protocolos de replicación. ....	25
10.10.1. Recolección de muestras en el campo .....	25
10.10.2. Aislamiento.....	26
10.10.3. Reactivación .....	26
10.10.4. Producción del inóculo en cajas petri .....	27
10.10.5. Preparación de matrices .....	27
10.10.6. Preparación del sustrato.....	27
10.10.7. Inoculación del sustrato.....	28
10.10.8. Secado del producto .....	28
11. IMPACTOS (Técnicos, sociales, ambientales o económicos) .....	29
12. PRESUPUESTO .....	29
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
13.1. Conclusiones .....	29
13.2. Recomendaciones.....	29
14. BIBLIOGRAFIA.....	30
15. ANEXOS.....	38
Anexo No. 1 Aval del Traductor.....	38
Anexo No. 2 Base de datos en software Excel. ....	39
Anexo No. 3 Informe de anti plagio.....	39
Anexo No. 4 Manual de Producción de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	39

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Organización de la información mediante la herramienta Zotero. ....	14
Gráfico 2 Secuencia metodología utilizada. ....	16
Gráfico 3 Palabras claves utilizadas por otros autores (Gráfico de nodos).....	17
Gráfico 4 Generación de artículos científicos año 1960 – 2020.....	18
Gráfico 5 Idiomas de publicaciones.....	18

Gráfico 6 Protocolos de captura, aislamiento y propagación .....	19
Gráfico 7 Placa petri con conidios de <i>M. anisopliae</i> .....	24
Gráfico 8 Gráficos de captura de insectos con conidios de <i>M anisopliae</i> .....	25
Gráfico 9 Colonización de <i>M. anisopliae</i> .....	26
Gráfico 10 Medios de preparación .....	27
Gráfico 11 Arroz inoculado con cepa de <i>M anisopliae</i> .....	28

#### **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	10
Tabla 2 Los 10 países con más documentación desde el año 2000.....	20
Tabla 3 Ingredientes de agua agar .....	22
Tabla 4 Ingredientes agar papa dextrosa.....	23
Tabla 5 Ingredientes de Fitolevadura .....	23
Tabla 6 Ingredientes de sabouraud .....	23
Tabla 7 Ingredientes de miel pepto agar .....	23

#### **INDICES DE CUADROS**

Cuadro 1 Actividades planteadas en función de los objetivos específicos .....	4
Cuadro 2 Operadores booleanos utilizados en la revisión con un ejemplo que explica la aplicación de estos. ....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación es una revisión bibliográfica del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* enfocada en recabar información relevante. Los aspectos tomados en cuenta en la investigación fueron ecología, captura, aislamiento, propagación del hongo. Tomando como fuente de investigación a estudios en Google Académico y la biblioteca virtual de la UTC referente a captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*. La información encontrada se almaceno en el asistente bibliográfico Zotero luego se registró la información en Excel en un modelo de lectura y registro.

Con el análisis de toda la información se pudo establecer protocolos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*, además se establecerá información para realizar un a manual práctico que ayude al entendimiento de hongos entomopatógenos en específico con *Matarhizium anisopliae*.

Aunque muchos microorganismos pueden ser efectivos para el control de plagas no todos pueden ser utilizados como agentes de control microbial, para que estos sean usados como agentes de control biológico tienen que ser seguros para los seres humanos, genéticamente estables, no patogénicos a los cultivos, eficaces contra un amplio rango de insectos plaga, compatibles con las medidas culturales, fáciles de usar y que tenga una relación beneficio costo favorable para el agricultor.

La utilización de microorganismos benéficos como hongos entomopatógenos, involucra una serie de procesos para su producción masiva, desde la preparación del materiales y medios de cultivo, así como técnicas de asepsia para evitar contaminantes, cuyo objetivo principal es la obtención de material que, una vez aplicado en campo, actúe directamente como el estado más infectivo del microorganismo o posibilite la formación de ese estado en el campo.

Este manual tiene como objetivo describir en forma detallada y simple todos los procesos para la obtención de un producto eficiente para ser utilizados en el control de plagas agrícolas.

## INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE MANEJO DE BIOCONTROLADORES (*Metarhizium anisopliae*). EN SU CAPTURA, AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN SALACHE-CEYPSA 2021”

Latacunga, Salache, Ceypsa

**Institución, unidad académica y carrera que auspicia**

Faculta de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**Nombres de equipo de investigadores**

Tutor: Ing. Ph.D. Edwin Marcelo Chancusig Espín. CC. 0501148837  
Lector 1: Ing. Mg. Klever Quimbiulco Sanchez. CC:1709561102  
Lector 2: Ing. Mg. Giovanna Parra Gallardo. CC: 1802267037  
Lector 3: Ing. Mg. David Carrera Molina. CC: 0501974703  
Responsable del Proyecto: Denisse Nathalia Negrete Cueva CC. 175295453-5

### **Área de Conocimiento.**

Agricultura - Agricultura, silvicultura y pesca - producción agropecuaria

### **Línea de investigación:**

#### **Línea 2. Desarrollo y seguridad alimentaria.**

El objetivo de esta línea será la investigación sobre productos, factores y procesos que faciliten el acceso de la comunidad a alimentos nutritivos e inoctrinos y supongan una mejora de la economía local.

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

Producción agrícola sostenible

#### **Línea de vinculación**

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

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La creación de nuevas tecnologías como el uso de hongos entomopatógenos es una alternativa al desarrollo sustentable de la agricultura. El mundo cada vez necesita de más tecnologías amigables, eficientes con prioridad en la investigación participativa utilizando material biológico y especies vegetales nativas, que nos brinden la posibilidad de realizar investigaciones y el resultado de estas hacerlas fácilmente aplicables a el entorno en el que la necesidad la requiere recibiendo aportes de otros investigadores, y de aquel que posea conocimientos.

Sin olvidar que el objetivo principal es el de dar la oportunidad de promover conocimientos, en este caso a través de la revisión bibliográfica del biocontrolador (*Metarhizium anisopliae*) enseñanzas, e ideas nuevas.

En la presente investigación "Revisión bibliográfica de protocolos de manejo de biocontroladores (metarhizium anisopliae). en su captura, aislamiento y propagación salache-ceypsa 2021" mediante el aislamiento de cepas nativas de hongos biocontroladores y la realización de evaluaciones de antagonismo contra las diferentes plagas que atacan a cultivos de importancia para nuestra alimentación. Por medio de la identificación de la especie y selección del biocontrolador se espera aportar al conocimiento de investigadores, estudiantes y productores en lo referente a control biológico,

lo que permitirá obtener como resultado el conocimiento de la biología y los procesos reproductivos del biocontrolador *Metarhizium anisopliae*.

### 3. BENEFICIARIOS

Los beneficiarios de este proyecto de investigación son los distintos usuarios de información en sus diferentes niveles.

**Beneficiarios directos:** Las diferentes personas con sus distintos niveles de interés: agricultores, casas comerciales, investigadores que quieran accesos a la base de datos.

**Beneficiarios indirectos:** Profesionales de la carrera de agronomía de la Universidad Técnica de Cotopaxi a través de la Coordinación de Investigación.

Los estudiantes de nivel académico superior de la Carrera de Ingeniería Agronómica serán beneficiados.

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Frente a tanta información encontrada en diferentes fuentes lo que se puede hacer es tomar toda la evidencia disponible sobre *Metarhizium anisopliae* y empezar a analizar desde un punto de vista sistemático y teniendo en cuenta cuán confiable es cada una. ¿Estudios provenientes de revistas confiables? ¿Se trata de estudios de aislamiento, captura, propagación? ¿En qué países se generaron estos estudios? Esto permite hacer una especie de resumen agrupando la distinta información encontrada de lo que dicen las evidencias disponibles hasta el momento. La revisión bibliográfica tiene mayor poder de evidencias que por estudios separados. Estos análisis que engloban las evidencias disponibles hasta un momento se conocen como revisiones bibliográficas o estados del arte y se consideran como estudios confiables y de evidencia suficiente.

Según ABC, (2016), las revisiones bibliográficas, es un proceso sistemático que se recoge la información a través un proceso que interpreta, modifica y crea conocimientos vive directamente una realidad, de esta manera puede recoger datos no distorsionados por una situación irreal.

En control de enfermedades en Ecuador se basan en prácticas de manejo convencional que resultan costosas para los agricultores, quienes recurren a aplicaciones de fungicidas que muchas de las veces resultan ineficientes o a su vez el número de aplicaciones realizadas es exagerada rebasando el grado de toxicidad de los productos. Prácticas que solo contribuyen a la contaminación del suelo y deterioro de la biota del suelo. (Torres & Capote, 2004).

El uso de hongos entomopatógenos constituye una estrategia biológica ampliamente utilizada dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP)

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General:

- Revisión bibliográfica de los protocolos de manejo de biocontroladores (*Metarhizium anisopliae*) en su captura, aislamiento y propagación.

### 5.2. Objetivos Específicos:

- Recopilar bibliografía del manejo de los protocolos en su captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*.
- Sistematizar la información bibliográfica encontrada de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*.
- Identificar los métodos adecuados de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*.

## 6. Actividades y sistema de tareas en relación con los objetivos planteados.

El presente estudio consideró las siguientes actividades a realizar por cada objetivo trazado anteriormente tomando como fuente actividades realizadas en revisiones sistemáticas de literatura.

*Cuadro 1 Actividades planteadas en función de los objetivos específicos*

Objetivo	Actividades	Resultados de la actividad	Medio de Verificación

Compilar información bibliográfica de fuentes primarias y secundarias de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Recopilación de documentos bibliográficos, de fuentes primarias y secundarias acerca de protocolos de captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Información bibliográfica de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Revisión documental.
Sistematizar la información bibliográfica encontrada de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Clasificación y sistematización del Material bibliográfico. Validación de la información necesaria y suficiente para la elaboración de la base de datos. Ingreso de la información a la base de datos de los protocolos de captura, aislamiento y propagación <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Codificación de categorías de los documentos en Excel. Base de datos con información validada de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Base de datos Zotero Base de datos Excel Fuentes bibliográficas
Identificar los métodos adecuados de los protocolos de captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i>	Obtención de los métodos más efectivos para captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Realizar un Manual de los métodos adecuados de los protocolos.	Protocolos adecuados para captura, aislamiento y propagación de <i>Metarhizium anisopliae</i> . Manual de protocolos del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> .	Lista de protocolos.  Base de datos en Zotero.

Fuente: Negrete, 2021

## 7. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 7.1. Microorganismos del suelo

El suelo al ser un sistema dinámico, proporciona un hábitat altamente heterogéneo para una gran diversidad de microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoarios y animales (Torres & Capote, 2004). Según Velázquez et al., 2002 un gramo de suelo es capaz de albergar hasta 10 mil millones de microorganismos y entre estos, solo el 1% o menos son cultivables. Las razones por las cuales los

microorganismos no se desarrollan en medios de cultivo puede ser, por ausencia de simbioses, nutrientes o superficies, exceso de compuestos inhibidores, combinaciones incorrectas de temperatura, presión o composición del gas atmosférico, la acumulación de productos de desecho tóxicos de su propio metabolismo y la tasa de crecimiento intrínsecamente lenta o dispersión rápida de las colonias (Simu & Hagström, 2004).

Los microorganismos son fundamentales para el mantenimiento de las funciones del suelo. Están implicados en procesos claves, como la formación de la estructura del suelo, descomposición de la materia orgánica, la eliminación de toxinas y el ciclo del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (P. Garbeva, 2004). Además, pueden actuar como supresores de enfermedades de las plantas, transmitidas por patógenos del suelo (John W. Doran, 2000).

Entre los microorganismos y las plantas existe toda una gama de interacciones ecológicas tales como parasitismo, comensalismo, mutualismo y simbiosis (Zhang et al., 2018). Todas estas interacciones han despertado un gran interés en los científicos para caracterizar y entender, principalmente las interacciones positivas que promueven el crecimiento de las plantas. Dicho crecimiento puede deberse a dos mecanismos, como la inhibición de las cepas microbianas patógenas y mediante el aumento de la disponibilidad de los nutrientes del suelo (Jacoby et al., 2017)

En los ecosistemas naturales, la mayoría de los nutrientes como Nitrógeno, Fosforo, y Azufre, están formando parte de moléculas orgánicas, lo que disminuye su disponibilidad. Para acceder a estos nutrientes, las plantas dependen de ciertos microorganismos del suelo que poseen el metabolismo para despolimerizar y mineralizar los compuestos orgánicos y extraer dichos nutrientes, que posteriormente serán liberados cuando estos microorganismos mueran (Christopher B. Craft, 1997). Este proceso también incluye a los iones como el amonio, nitrato, fosfato y sulfato que son las formas de nutrientes preferidos por las plantas (Bender et al., 2016).

## **7.2. Distribución de los microorganismos del suelo**

La ciencia que estudia la distribución de los seres vivos es la biogeografía, la cual se define como el estudio de la distribución de los organismos a través del espacio y el tiempo. Su objetivo principal es revelar donde viven los organismos y su abundancia, y determinar aquellos factores ambientales que seleccionan o mantienen la presencia de éstos (Bastian et al., 2009).

La investigación de microorganismos, incluyendo bacterias, arqueas, virus y hongos, ha proporcionado pruebas que muestran patrones biogeográficos, algunos de los cuales son similares a los de los organismos más grandes (Jennifer B. Hughes Martiny, 2006). Varias investigaciones indican la existencia de cierto grado de endemismo debido a la adaptación local, el aislamiento por la distancia, o ambos (Aguirre-Acosta et al., 2014). Noah Fierer & Robert B. Jackson, 2005 demostraron que la diversidad bacteriana no está relacionada con la temperatura, latitud y otras variables, que influyen fuertemente en la diversidad de plantas y animales, y que la composición de la comunidad fue en gran parte independiente de la distancia geográfica. Estas investigaciones dan a entender lo complejo de la distribución de los microorganismos, por lo cual no todos los resultados obtenidos son similares, y por ende varían dependiendo del tipo de microorganismo, la ubicación geográfica, las condiciones ambientales y la vegetación presente.

### **7.3. Diversidad de microorganismos del suelo**

La diversidad describe la variedad y abundancia relativa de los microorganismos. En términos ecológicos moleculares, se puede definir como el número y distribución de diferentes tipos de secuencias presentes en el ADN (ácido desoxirribonucleico) obtenido de una muestra ambiental. (Torsvik & Øvreås, 2002). Las investigaciones moleculares indican que la diversidad de microorganismos en el suelo es mucho más amplia de lo que se puede discernir con técnicas de cultivo. Según (Nicholson & Hirsch, 1998) aproximadamente el 1% de los microorganismos se puede cultivar de forma eficiente en medios de cultivo. Las actividades microbianas en el suelo que participan en los ciclos de carbono y nitrógeno, así como las interacciones simbióticas con las plantas son consideradas benéficas. Mientras que las actividades que producen óxido nitroso, emisiones de metano y enfermedades en las plantas son consideradas nocivas (P. C. Brookes, 2006). La falta de conocimiento de la microbiota del suelo, así como la heterogeneidad de la composición del suelo, el gran número de taxones distintos (> 106 ) y el gran número de células individuales (>109 ) obstaculizan las investigaciones sobre los microorganismos del suelo, pero su estudio es de suma importancia para entender dichas actividades e interacciones (Singh et al., 2011).

### **7.4. Factores que influyen en la diversidad de microorganismos en el suelo**

Las prácticas de manejo del suelo, tales como la rotación de cultivos, labranza, fertilización, aplicación de compost, abono, o de pesticidas y riego, afectan en gran medida los parámetros microbianos del suelo (N. C. M. Gomes, 2001). También influyen la textura, el pH, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de materia orgánica, ya sea directamente, proporcionando un hábitat específico para ciertos microorganismos, o indirectamente, afectando el funcionamiento de las raíces y los exudados (Gelsomino et al., 1999). Esto quiere decir que el tipo de suelo es un determinante importante del microbiota de las raíces (Edwards & Thompson, 1973).

La fertilidad del suelo, la vegetación y los pisos altitudinales influyen también en la abundancia y diversidad de hongos y bacterias, tal como lo reportó (Pablo Cuevas-Reyes, 2003), donde comprobaron que los suelos con buena fertilidad contenían mayor diversidad de microorganismos que suelos con baja fertilidad. Además, la fertilización química en suelos con un alto contenido de carbono orgánico aumenta la actividad enzimática de los microorganismos. Sin embargo, cuando la fertilización reduce el pH del suelo por debajo de un cierto umbral, los microorganismos son afectados negativamente (Geisseler & Scow, 2014)

Muchas plantas al liberar, a través de sus raíces, una amplia variedad de compuestos en el suelo, incluyendo etileno, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, polisacáridos y enzimas (Christine M Eisenhauer, 2010), crean un entorno único para los microorganismos que viven en la rizósfera y esto ocasiona una selección de las comunidades microbianas (Abawi & Widmer, 2000). Según los resultados obtenidos por (N. Eisenhauer, 2010), en la que determinaron la influencia de la vegetación arbustiva en la biomasa microbiana, concluyeron que después de cuatro años de la conversión de tierras cultivables en pastizales experimentales, mostraron cambios estacionales distintos en la estructura de la comunidad microbiana del suelo, que probablemente se debieron a la disponibilidad y calidad de los recursos orgánicos.

Según (Anu Eskelinen, 2009), las diferencias en la composición de la comunidad microbiana podrían atribuirse a variaciones en los materiales del suelo, en lugar de la altitud o la vegetación. Pero (Burns et al., 2013), reportaron una influencia significativa de la vegetación en la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas en los suelos de Alaska. El aumento de la altitud generalmente afecta de forma negativa a los microorganismos, esto quiere decir que a mayor altitud menor es la abundancia y diversidad (Schinner et al., 2012). Por ejemplo, la diversidad de la comunidad bacteriana de las montañas del Himalaya disminuye al aumentar la altitud (Nayak et al., 2012).

### **7.5. Microorganismos Benéficos**

Son microorganismos que ayudan a la eliminación de los insectos presentes en el suelo, estos microorganismos tienen la capacidad de atacar a los insectos que causan daños en los cultivos y así poder mantener un equilibrio químico en el ecosistema. (Kristiansen et al., 2007)

### **7.6. Aplicación de los Microorganismos Benéficos:**

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

### **7.7. Funciones de los Microorganismos Benéficos**

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

### **7.8. Importancia de los microorganismos benéficos**

Los microorganismos que se encuentran en el suelo, son los componentes más importantes de este, los mismos constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. (Cervantes et al., 1994).

Las poblaciones microbianas del suelo están inmersas en un marco de interacción que afecta el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo, ellas están involucradas en actividades fundamentales que aseguran la estabilidad y productividad, tanto de los agroecosistemas como de los ecosistemas naturales. (Ayala-Zermeño et al., 2015).

Los microorganismos en el suelo son co-responsables del suministro de elementos o compuestos inorgánicos nutricionales, orientados particularmente hacia las plantas superiores, así como la función específica de descomponer y mineralizar la materia orgánica que de una u otra forma se incorpora al suelo. (Shah et al., 2005).

### **7.9. Ecología de *Metarhizium anisopliae***

*M. anisopliae* es un hongo transmitido por el suelo y consta de numerosos genotipos con una distribución mundial, desde el Ártico hasta los trópicos. No se conocen informes sobre *M. anisopliae* como hongo transmitido por el aire (Zimmermann, 2007). Se han establecido métodos para estudiar la distribución y la densidad. Para las "colecciones de hongos" o el análisis cualitativo del suelo, el "Método del cebo de galerías" se utiliza a menudo (Zimmermann, 1993). Utilizando larvas de gusanos como cebo ya que sensibles a las infecciones fúngicas, se exponen a las muestras de suelo y se utilizan como insectos cebo.

Las esporas de los hongos entomopatógenos podrían ser transferidas también por lombrices de tierra (Shah et al., 2005), artrópodos del suelo como colémbolos, ácaros y pequeñas larvas de dípteros y larvas de dípteros y coleópteros (San Andrés et al., 2014), el viento y el agua (Zimmermann, 1982, p. 200).

Numerosos factores bióticos y abióticos influyen en la capacidad de los hongos entomopatógenos para infectar a sus huéspedes y persistir en el medio ambiente. Entre ellos se encuentran los enemigos antagónicos, el comportamiento, la condición fisiológica y la edad del huésped; el vigor y la edad del patógeno; la luz solar desecación, temperatura, humedad y umbrales de inóculo, presencia de pesticidas (Butt et al., 1994)

El establecimiento y la persistencia de *M. anisopliae* es un factor importante para el éxito del control del agente. Esto y la capacidad de permanecer activo en el medio ambiente pueden definirse como competencia ambiental (Noah Fierer & Robert B. Jackson, 2005). El suelo parece ser un medio favorable para la aplicación del inóculo fúngico, sin embargo, es un medio muy complejo, que varía en su composición mineral, textura y estructura y muestra un entorno extremadamente competitivo (Keller et al., 2003).

Dado que no sólo los insectos plaga pueden ser atacados por este hongo, la evaluación de los efectos no objetivo y el establecimiento de una evaluación de riesgos cuando se aplican cepas de hongos. Como se sabe que *M. anisopliae* es conocido por infectar a una amplia gama de insectos de diferentes órdenes, hay que prestar especial atención en el nivel de las cepas. La mayoría de los insectos hospedadores de *M. anisopliae* pertenecen a los Coleópteros y especialmente a los insectos que viven en el suelo. Algunas cepas y genotipos son más restringidos (Ferron, 1978). Jaronski & Jackson, (2008) informaron de que los aislados son aún más específicos en condiciones de campo en comparación con los estudios de laboratorio. Las cepas del hongo entomopatógeno varían en cuanto a virulencia persistencia, rango de hospedaje y otros criterios, como la temperatura óptima, la resistencia a los rayos UV, el crecimiento y la capacidad de esporulación. y la capacidad de esporulación.

Los aislados suelen mostrar un alto nivel de especificidad con respecto a la especie de la que fueron aislados (Lacey et al., 1995). Se sugiere que la interacción entre la plaga de insectos y el patógeno es parte de un largo proceso de coevolución. En este contexto, las cepas de hongos entomopatógenos

utilizadas para el control microbiológico tienen al menos una ventaja temporal en esta relación. (Noah Fierer & Robert B. Jackson, 2005).

La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en laboratorios exponiendo a los insectos a un inóculo fúngico definido (susceptibilidad fisiológica) (Inglis et al., 2008). Sin embargo, para las aplicaciones de campo, la susceptibilidad ecológica es importante y debe determinarse para obtener conclusiones cualitativas.

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

Durante los últimos años, los aislados de *M. anisopliae* han sido caracterizados por varias técnicas moleculares, además de por técnicas morfológicas, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron para estudiar la diversidad genética y de los aislados de *M. anisopliae*, (Dimbi et al., 2013; Luz et al., 1998).

### 7.10. Características de *Metarhizium anisopliae*

El hongo *Metarhizium anisopliae* (Figura 2-1), es biocontrolador, con mayor potencial entomopatógeno en el control de insectos plaga, pertenece al reino Fungi, clase Hyphomycetes, cuyas características se indican en la tabla 2-1. (Albuquerque et al., 2005).

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae*

<b>REINO:</b>	<b>FUNGI</b>
<b>DIVISIÓN:</b>	Ascomycota
<b>CLASE:</b>	Sordariomycetes
<b>ORDEN:</b>	Hypocreales
<b>FAMILIA:</b>	Clavicipitaceae
<b>GÉNERO:</b>	<i>Metarhizium</i>
<b>ESPECIE:</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i>

Fuente: (Driver et al., 2000)

### 7.11. Características del Hongo *Metarhizium anisopliae*

El hongo *Metarhizium anisopliae* presenta las siguientes características:

Esta especie en medio PDA, al crecimiento presenta un micelio con borde blanco, con grupos de conidióforos que se tornan coloreados.

Presenta una pigmentación característica que va desde el color verde olivo a amarillo verdoso, de color miel o amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el centro del hongo.

Su aspecto es algodonoso.

Su reproducción es asexual.

Es de tipo biocontrolador con mayor potencial entomopatógeno para controlar insectos plaga en diversos cultivos. (Quesada-Béjar, 2020).

### 7.12. Modo de Acción de *Metarhizium anisopliae*

Este hongo se adhiere a la cutícula de los insectos y entra al interior del mismo por las partes blandas o por vía oral. Al encontrarse en el interior del insecto, ocurre la germinación de las esporas y el micelio produce la toxina que ocasiona la muerte al huésped en un intervalo de 3 a 4 días.

Los síntomas que presenta el insecto son: sensibilidad, movimientos no coordinados y parálisis del cuerpo. Dependiendo de las condiciones de humedad se inicia el ciclo de nuevo, el insecto queda cubierto por el micelio, se producen las esporas, las mismas que son arrastradas por el viento y las lluvias a otros lugares infectando a otros insectos (Quesada-Béjar, 2020).

### 7.13. Especies sensibles al Hongo *Metarhizium anisopliae*

*Metarhizium anisopliae*, es un hongo entomopatógeno, tiene la capacidad de eliminar a insectos como: trips, ácaros, babosas, entre otros. Este tipo de hongo posee un gran potencial en sus cepas que hace que insectos que son resistentes a insecticidas comunes sean eliminados. Este tipo de hongo se puede utilizar tanto en la agricultura orgánica como también en la agricultura convencional. Puede usarse con insecticidas sistémicos, bactericidas y fertilizantes foliares (Kristiansen et al., 2007).

### 7.14. *M. anisopliae* en combinación con *B. bassiana*

Algunas de las plagas que controla son: Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood), trips (*Thrips* spp), gallina ciega (*Phyllophaga* spp. Bates), rosquilla negra (*Spodoptera littoralis* Boisduval), entre otras (Polanczyk et al., 2010; Mirhaghparast et al., 2013), así como plagas de artrópodos en la producción avícola (de Oliveira et al., 2014). Actualmente se utiliza como producto comercial de control biológico en combinación con *M. anisopliae*. *B. bassiana* y *M. anisopliae* se combinan debido a las estrategias que cada uno sigue, ambos su modo de acción es de contacto, solo que el primero tiene una estrategia tóxica mediante oosporeinas e invade al hospedero mientras que el segundo tiene una estrategia de crecimiento con la formación de apresorios e invasión del hospedero, esto hace que el efecto para el control biológico de plagas sea mayor (Rustiguel et al., 2018).

## 8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS.

- ¿Qué se conoce acerca del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*?
- ¿Qué métodos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae* existen?

## 9. METODOLOGIA

Se llevó a cabo una estrategia de búsqueda integral, que incluyó como base principal a google scholar o google académico Scielo, Redalyc, Dialnet, y búsqueda manual de revistas relevantes en los idiomas de inglés, español y portugués, tomando en cuenta una limitación de los 10 años en donde se seleccionó y se analizó los protocolos adecuados de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*

### 9.1. Estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda sistemática desde abril de 2021 en Google scholar. Los términos de búsqueda utilizados en las bases de datos incluyeron: *Metarhizium anisopliae* más los siguientes términos: hongos

entomopatógenos (EPF Entomopathogenic fungi), captura (capture), aislamiento (isolation), propagación (propagation), ecología (ecology), aplicaciones (applications),

### **9.2. Definición de temas**

Los temas más importantes para esta investigación fueron: ecología del hongo, captura, aislamiento, propagación del hongo *Metarhizium anisopliae*

### **9.3. Operadores booleanos**

En la investigación fueron considerados para que la información sea referente al problema y para responder a la pregunta de investigación.

*Cuadro 2 Operadores booleanos utilizados en la revisión con un ejemplo que explica la aplicación de estos.*

OPERADOR	Ejemplo o aplicación
<b>AND</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Es la intersección de dos conjuntos o más.</li> <li>– Conecta los conceptos o ideas principales de un tema.</li> <li>– Disminuye el número de registros recuperados</li> </ul>	<p><i>“Matarhizium anisopliae” AND “ecología”</i></p>
<b>OR</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Es la unión de dos o más conjuntos.</li> <li>– Agrupa sinónimos, cuasi-sinónimos o términos relacionados.</li> <li>– Se recupera información que tenga al menos uno de los términos.</li> <li>– Amplía el enfoque de la búsqueda y por tanto el número de registros recuperados.</li> </ul>	<p><i>“Matarhizium anisopliae” OR ecología AND aplicación</i></p>
<b>NOT</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Negación o exclusión de conjuntos.</li> <li>– Se usa para eliminar los términos no deseados.</li> <li>– Se recuperan registros que no incluyen el término excluido.</li> </ul>	<p><i>Ecología AND Matarhizium anisopliae AND captura NOT marcadores moleculares</i></p>

**Fuente:** (SciELO Ayuda, s. f.)

#### **9.4. Estrategia de búsqueda en base de datos**

Se realizó la búsqueda de investigaciones relacionadas de manera detallada y objetiva acerca del aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae* para el control de plagas en los cultivos agrícolas. Posteriormente, se utilizaron palabras claves provenientes de las variables de la investigación de diferentes recursos digitales disponibles. Por lo cual, en la presente investigación se trabajó con fuentes de información confiables encontradas en Google académico.

Palabras claves en inglés como en español más operadores booleanos como:

- “Ecología”, OR “Ambiente”, AND “*Metarhizium anisopliae*”, “hongos entomopatógenos”

- “Captura”, AND “*Metarhizium anisopliae*”
- “Aislamiento” AND “*Metarhizium anisopliae*”.
- “Propagación” OR “condiciones ambientales” AND “*Metarhizium anisopliae*”.
- “Manejo” OR “Management” AND “*Metarhizium anisopliae*”.

Nota: los idiomas utilizados para la búsqueda fueron español e inglés.

## 9.5. Gestión bibliográfica

Toda la información descargada se encuentra en el gestor bibliográfico Zotero, que permite construir bibliotecas. Zotero es útil para cualquier tipo de investigación documental. Se basa en la organización categórica de los documentos y referencias en múltiples formatos. Zotero ofrece una integración con los navegadores de internet y la posibilidad de sincronización y el uso de diferentes formatos. (Eduardo, 2014).

Los 330 documentos encontrados fueron agrupados en 4 temas de interés. A su vez se dividió en grupos (tema) o códigos relacionados que facilita el análisis de la información en las etapas posteriores. En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se observa un pantallazo con parte de los estudios inales almacenados en el software.

Gráfico 1 Organización de la información mediante la herramienta Zotero.

The screenshot displays the Zotero library interface. At the top, a search bar contains the query "ecology AND metarhizium anisopliae". Below the search bar, there are search results with abstracts. A large blue arrow points from the search results to a sidebar on the right. The sidebar has a search filter dropdown set to "Metarhizium" and a list of recommended articles. The main content area shows a detailed view of a specific article titled "Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control". The article is from the journal "Biological Control", Volume 43, Issue 2, November 2007, Pages 145-155. The interface also shows a "Purchase PDF" button and a "View details" link for the article.

Fuente: Negrete, 2021

Esto permitió extraer metadatos de cada documento la información preliminar como: número de publicaciones tipos de estudios y países donde se realizaron los estudios.

### 9.5.1. Limpieza de base de datos

Criterios de inclusión Se incluyeron y descargaron toda la documentación relacionada al hongo entomopatógeno *Metarhizium ansopliae*.

Criterios de inclusión:

- Palabras clave.
- Publicaciones: documentos que se encuentren en búsqueda avanzada y con los operadores lógicos mencionados.
- Fuente documental: Google académico, bibliotecas UTC.
- Estudios tanto en inglés como en español
- Estudios realizados sobre *Metarhizium anisopliae*

Selección de los documentos: Con los documentos ya descargados en “Zotero” y eliminados duplicados. Se procedió a la lectura del resumen del artículo o del artículo completo si el caso lo ameritaba. Este paso permitió selección la selección final de los documentos. Los documentos fueron registrados en una matriz de Microsoft Excel. En el caso de esta revisión se encontraron 378 artículos pertinentes.

#### **9.5.2. Codificación de base de datos**

La extracción de datos de los artículos seleccionado se ejecutó de manera autónoma empleando una metodología sistematizada de lectura y registro (Levy & J. Ellis, 2006). La información de interés de los estudios publicados fue registrada en una matriz en Excel.

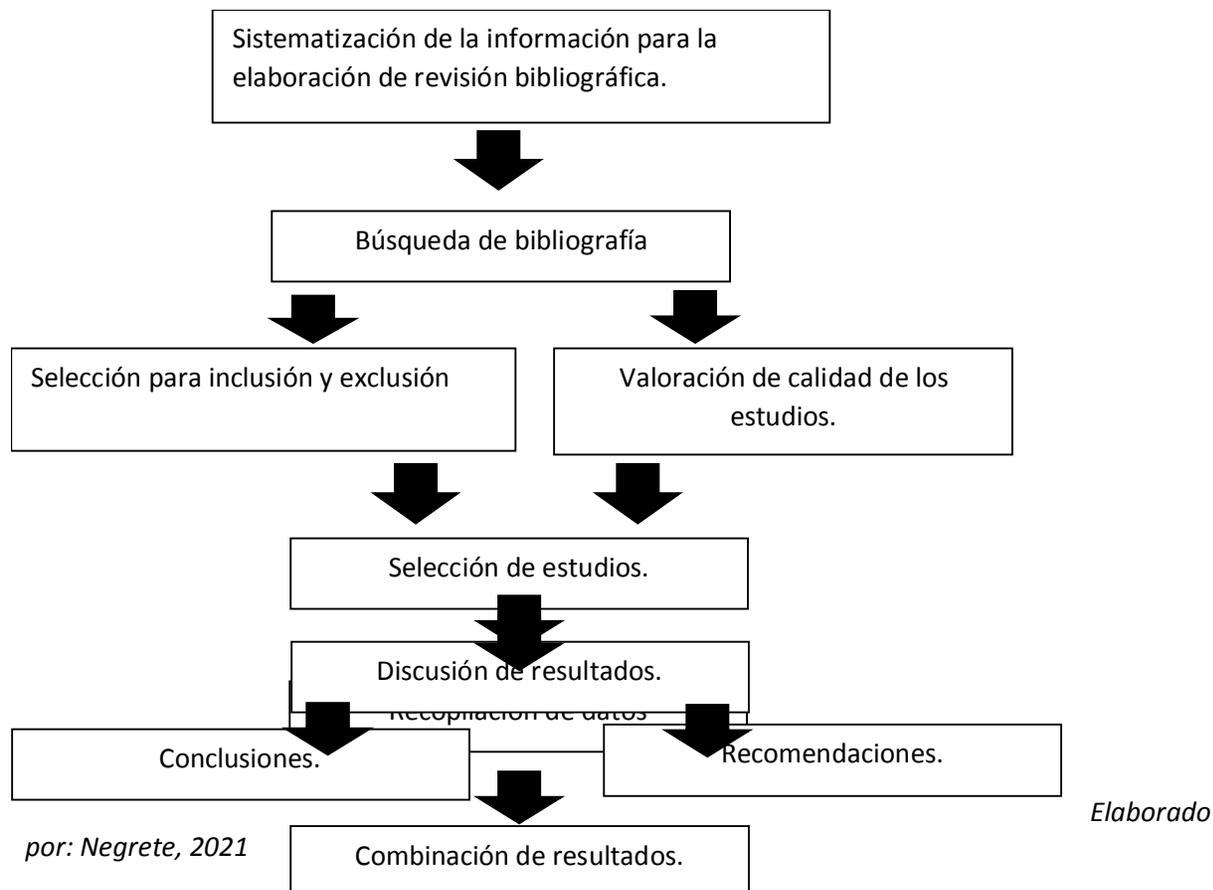
Una vez seleccionados los todos los estudios que se iban a incluir y que cumplían con los criterios establecidos el paso a seguir fue codificarlos. La codificación el ciclo de proceso se codificación a continuación:

Luego de la codificación de cada uno de los 378 artículos. El paso siguiente la formación de la revisión con la conformación de los distintos temas y conceptos descritos en la codificación de una forma sistemática y manteniendo un orden. en la información. Sé puede observar cómo partir de la tarea de filtrar dentro de las diferentes categorías se puede llegar al resultado final que es la construcción y reporte de la revisión de literatura.

#### **9.6. Procedimiento**

En la Figura 2. Se detallaron las acciones que se tomaran para desarrollar el presente proyecto de investigación y sus respectivas etapas.

Gráfico 2 Secuencia metodología utilizada.



Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la metodología de revisión sistemática para obtener una respuesta general y detallada en el aislamiento, captura y propagación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

## 10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 10.1. Revisión Bibliográfica

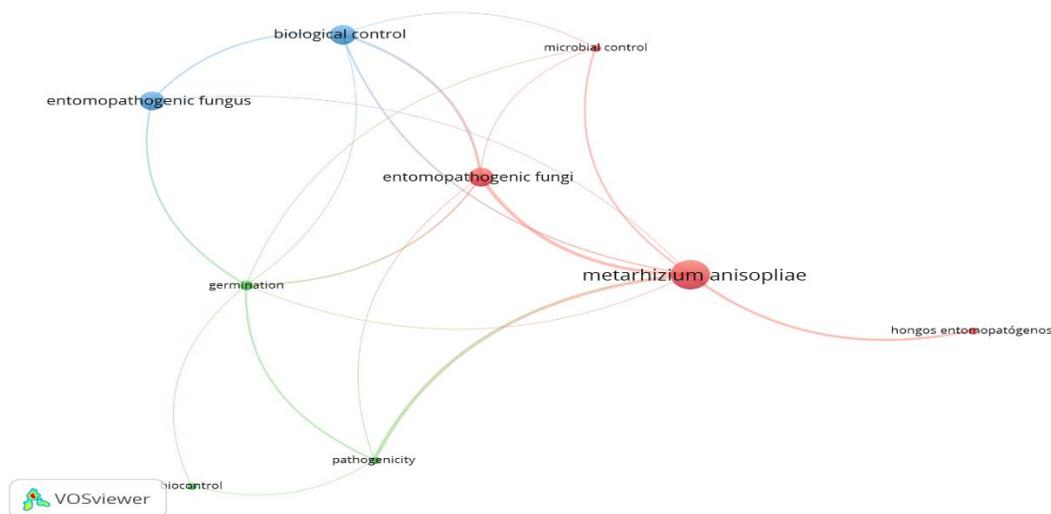
El número de publicaciones donde se abordan aspectos relacionados a el aislamiento, captura y propagación con *M. anisopliae* es abundante, a continuación, se analizan los indicadores bibliométricos (más citados, palabras más utilizadas a para su búsqueda) referentes a este microorganismo.

#### 10.1.1. Documentación

Esta revisión contempla 330 menos los documentos duplicados dan un total de 318 documentos descargados entre los meses de abril y mayo luego se sistematizo la información en tablas de Excel para optimizar el trabajo. Entre los cuales consta libros, artículos científicos, tesis, documentos,

notas científicas. En el gráfico se puede apreciar las palabras claves utilizadas por los autores de cada uno de los artículos descargados. El gráfico se realizó con la ayuda del software VOSviewer de dominio libre en el internet y que sirve para análisis de datos y búsqueda de información.

Gráfico 3 Palabras claves utilizadas por otros autores (Gráfico de nodos)



Elaborado por: Negrete, 2021

## 10.2. Distribución de la información

Esta revisión bibliográfica se basa en 313 documentos bibliográficos que consta de Artículos Científicos, Libros, Sección de libros, tesis y Pagina Web, los cuales fueron seleccionados con la metodología anteriormente mencionada, contando con información respecto a los métodos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*.

Tabla 3 Generación de documentos año 1978 hasta el año 2021

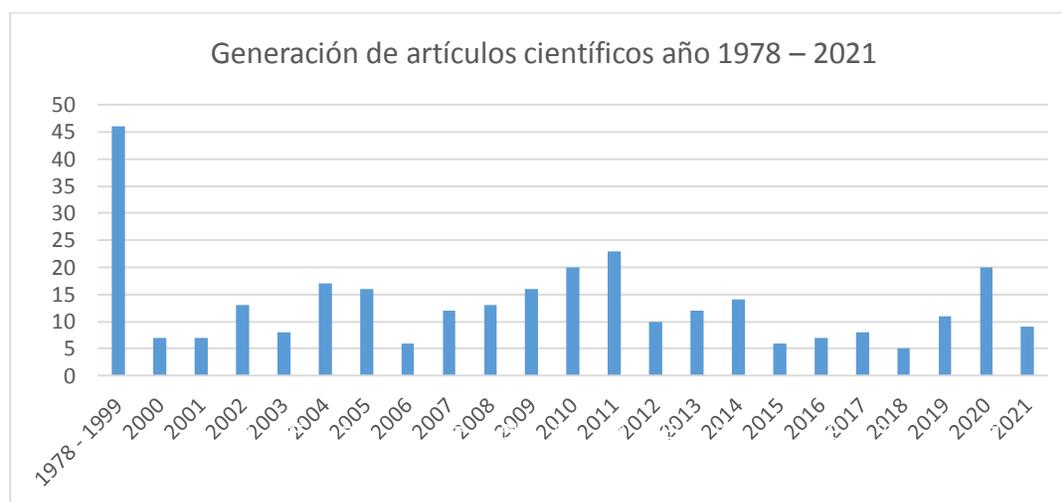
Descripcion	Cantidad
Artículos Científico	306
Libros	8
Sección de libros	2
Tesis	3
Pagina Web	11
<b>Total</b>	<b>330</b>

Elaborado por: (Negrete, 2021).

### 10.3. Años con mayor generación de investigaciones en torno a *M. anisopliae*.

De acuerdo al gráfico N° 4 indica que los estudios con mayor índice de publicaciones sobre el tema de investigación fueron en el año 2011, seguido por los años 2010 y 2020. Los artículos encontrados desde el año 1978 hasta el año 1999 fueron descartados por desactualización de conocimientos. Se generaron 46 estudios entre 1978 hasta 1999 (22 años).

Gráfico 4 Generación de artículos científicos año 1960 – 2020.

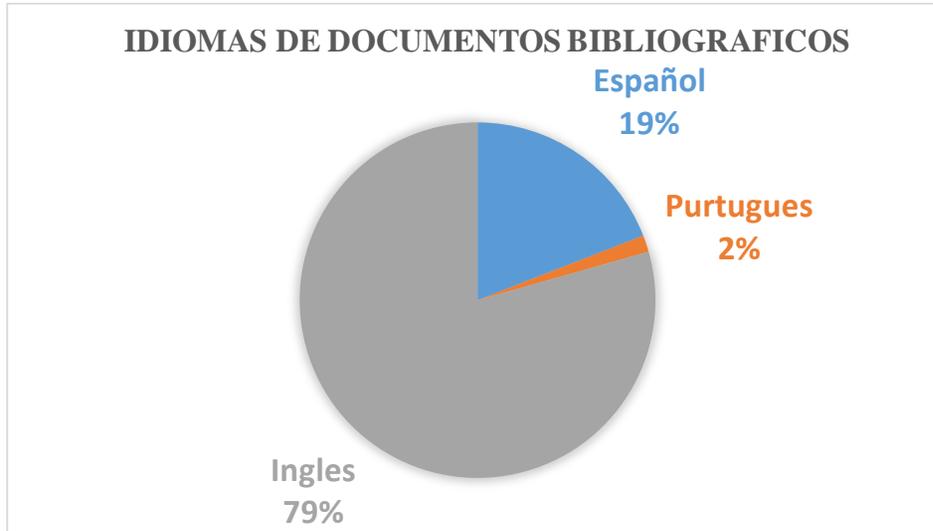


Elaborado por: (Negrete, 2021).

### 10.4. Idiomas de documentos Bibliográfias.

De acuerdo al gráfico N° 5 los documentos bibliográficos se encontraron en inglés con un 79 % seguido del idioma español con un 19% y un 2% del idioma portugués.

Gráfico 5 Idiomas de publicaciones.

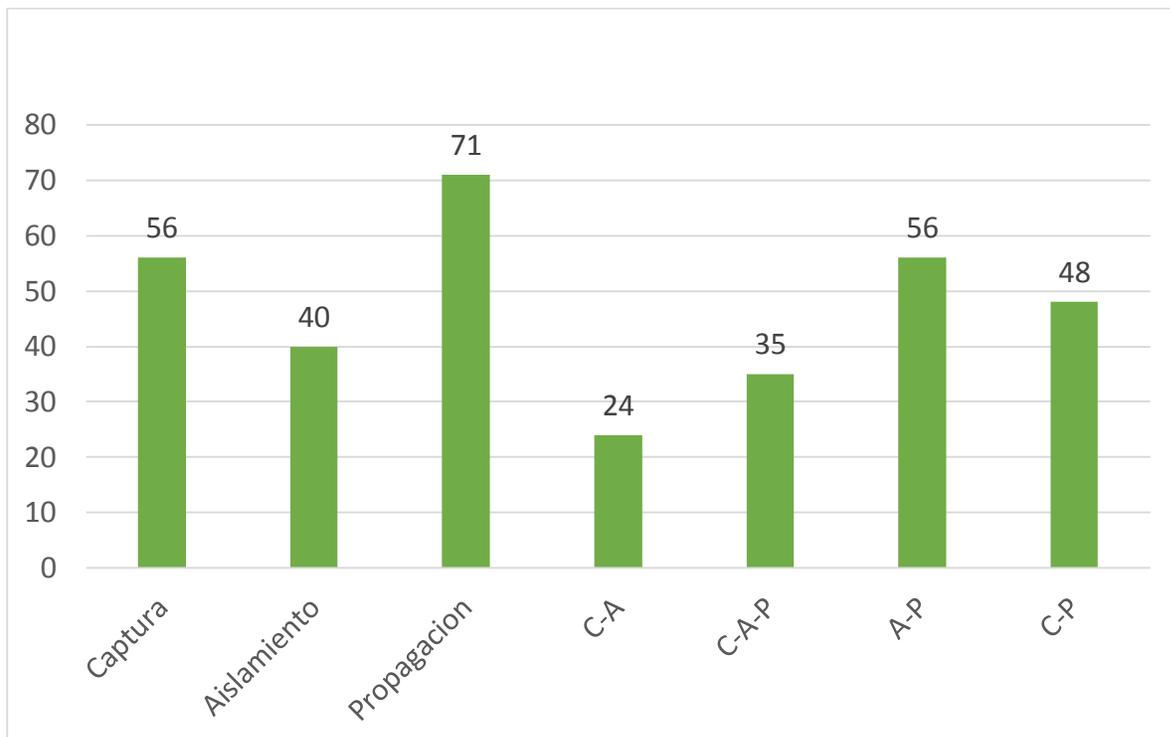


*Elaborado por: (Negrete, 2021).*

#### **10.5. Protocolos de captura, aislamiento y propagación.**

De acuerdo al gráfico N°6 se encontró 56 documentos que hace referencia sobre métodos de captura, 40 documentos que trata de métodos de Aislamiento y 71 documentos que rige a métodos de Propagación y un total de 163 documentos que contiene dos o tres temas (captura, aislamiento y propagación).

*Gráfico 6 Protocolos de captura, aislamiento y propagación*



*Elaborado por: (Negrete, 2021).*

### 10.6. Países con mayor generación de artículos: 2000 2021

De acuerdo a la Tabla 2, muestra a Estados Unidos como el país con mayores investigaciones realizadas 10 de los mismos hacen referencia a capturas y aislamientos. En Ecuador se encontró 4 estudios en torno a *M. anisopliae* los cuales dos son tesis, un manual de propagación, y un documento de aplicación y adaptación de bioinsecticidas del INIAP. Las investigaciones en *M. anisopliae* son de alguna manera cosmopolitas ya que figuran 42 países con investigaciones en algún aspecto del hongo entomopatógeno.

Tabla 2 Los 10 países con más documentación desde el año 2000.

PAIS	CANTIDAD DE DOCUMENTOS
ESTADOS UNIDOS	64
MÉXICO	32
BRASIL	26
COLOMBIA	16
REINO UNIDO	15
KENIA	13
CHINA	10
PAÍSES BAJOS	9
INDIA	9
EGIPTO	7

Elaborado por: (Negrete, 2021).

### 10.7. Documentos últimos 10 años

Aunque en otros estudios se han enfocado en establecer cuál de estos dos hongos tiene mejor efecto fungicida (Chávez et al., 2011), así como sus combinaciones con algunos insecticidas (Ashraf et al., 2017), con diversos compuestos químicos y métodos de aplicación (Castro et al., 2016), para el control de plagas. En general, los temas de investigación versan sobre formulaciones, mortalidad y virulencia, (A. Hussein et al., 2011, 2011; Castro et al., 2016) bioensayos en laboratorio (aislamiento, captura y propagación), evaluación en campo, y su evaluación para el control de diversas plagas.

### 10.8. Métodos de captura

Aunque *M. anisopliae* fue usado con aparente éxito el siglo pasado, se han hecho relativamente pocos avances en la comercialización de este hongo. En la revisión 8 estudios hablan de captura de *M. anisopliae* (A. Hussein et al., 2011, 2011; Benjamin et al., 2002; Dimbi et al., 2003; Ferron, 1978; San Andrés et al., 2014; Torres & Capote, 2004) de los ocho estudios se sintetizó la siguiente información:

Tupe et al., (2017) señala tres métodos de captura para *M. anisopliae* descritos a continuación:

### **10.8.1. Método de dilución en el suelo**

Recoger las muestras de suelo y los insectos micóticos (insectos con esporas de hongos) de diferentes campos de cultivo. Aislar los hongos entomopatógenos de las muestras de suelo utilizando el método de dilución del suelo.

Seleccionar y subcultivar las colonias individuales de esporulación en el mismo medio para obtener cultivos puros.

### **10.8.2. Captura de los insectos micóticos**

Recoger los insectos micotizados (Un cuerpo larvario duro es probable que esté infectado por un hongo entomopatógeno) del campo. En caso de infección bacteriana o vírica, el cuerpo del insecto muerto es blando

Recoger insectos vivos con comportamiento anormal, mala coordinación y movimientos bruscos.

Mantenga los insectos hasta su muerte y luego transfíralos a cámaras húmedas para que continúen con la micosis y la esporulación, si la hay, a 28 °C y 70-80% de HR.

Filtrar las esporas de los cadáveres que esporulan en el medio selectivo mencionado y obtener cultivos puros subcultivando 2-3 veces en el mismo medio.

### **10.8.3. Método del cebo**

En un vial que contenga aproximadamente 60 g de muestra de suelo, añada 4 larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) y mantenga los viales a  $25 \pm 2$  °C durante un período de 14 días.

Dé la vuelta a los frascos todos los días. Al cabo de 14 días, examine las muestras de suelo para detectar la presencia de larvas micorrizadas.

Aísle los hongos entomopatógenos por medio de esporas de cadáveres esporulados en un medio selectivo.

Una vez obtenidos los cultivos puros, transfiera los aislados a agar papa dextrosa (PDA) e incube a 28 °C y 70-80% RH durante 7 días para permitir la esporulación. Tras la esporulación, mantener los cultivos madre a 8 °C hasta su utilización.

## **10.9 Métodos de propagación**

En los métodos de propagación se encontró 10 estudios de los cuales se sintetizó la siguiente información.

### **10.9.1. Medios de cultivo de laboratorio**

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir

antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras. (Tupe et al., 2017)

Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo, sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). (Chelvi et al., 2011)

Los medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado. (A. Hussein et al., 2011)

El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8).

Para seguridad del que opera y evitar contaminaciones, los medios de cultivo se deben manipular en campanas de flujo laminar

## 10.9.2. Medios de cultivo y composición:

### 10.9.2.1. Agua agar

Es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy rala. Es especialmente usado para hacer aislamientos de punta de hifa. De acuerdo a la consistencia que se quiera dar al medio, se puede hacer con mayor o menor cantidad de agar.

*Tabla 3 Ingredientes de agua agar*

<b>Agar</b>	<b>10 g</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1 litro</b>

*Fuente: (Madriz, 2004)*

### 10.9.2.2. Papa dextrosa agar (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. Beauveria, Paecilomyces, Lecanicillium (Verticillium) y Metarhizium, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. (Chelvi et al., 2011)

Cuando se aíslan hongos a partir de insectos colectados del suelo, es recomendable acidificar el medio con ácido láctico al 25%. Se agregan 3 ó 4 gotas sobre el agar solidificado de la placa con el objeto de evitar el desarrollo de bacterias.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PDA), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva. (Fungaro et al., 1996)

Tabla 4 Ingredientes agar papa dextrosa

<b>Papa sin pelar</b>	<b>200 g</b>
<b>Dextrosa</b>	10 g
<b>Agar</b>	18 g
<b>Agua destilada</b>	1 litro

Fuente: (Madriz, 2004)

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

### 10.9.2.3. Fitolevadura

Este medio se usa para aislar hongos a partir de animales. Los hongos aislados de insectos crecen exuberantemente con micelio bien algodonoso y buena producción de esporas.

Tabla 5 Ingredientes de Fitolevadura

<b>Dextrosa</b>	<b>20 g</b>
<b>Extracto de levadura</b>	5 g
<b>Peptona</b>	5 g
<b>Agar</b>	18 g
<b>Agua destilada</b>	1 litro

Fuente: (Madriz, 2004)

### 10.9.2.4. Sabouraud

Es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación.

Tabla 6 Ingredientes de sabouraud

<b>Dextrosa</b>	<b>20 g</b>
<b>Peptona</b>	10 g
<b>Agar</b>	18 g
<b>Agua destilada</b>	1000 ml

Fuente: (Madriz, 2004)

### 10.9.2.5. Miel peptona agar

Este medio se recomienda porque tiene un pH que inhibe el desarrollo de algunas bacterias

Tabla 7 Ingredientes de miel pepto agar

<b>Miel de caña</b>	<b>60 g</b>
---------------------	-------------

<b>Peptona</b>	10 g
<b>Agar</b>	18 g
<b>Agua destilada</b>	1000 ml

Fuente: (Madriz, 2004)

Se pueden utilizar antibióticos como Penicilina + Estreptomina (30 – 50 ppm) que deben agregarse a los medios de cultivo después de ser esterilizados en autoclave y enfriarlos a una temperatura menor a 60 °C (Alcantara-Vargas et al., 2020).

### 10.9.3. Medios líquidos.

Los medios líquidos son aquellos a los que no se incorpora la sustancia solidificante, pudiendo tener la misma composición que los medios sólidos.

Son utilizados para obtener una producción masiva con fines de inoculación en sustratos de propagación. Los medios líquidos generalmente se colocan en un agitador continuo durante tres o más días de acuerdo a la especie que se está propagando. Cuando se trata de *M anisopliae*. en medio líquido las estructuras propagativas toman la forma de las levaduras.

Para evitar la contaminación con bacterias, es recomendable acidificar el medio contenido en la placa con unas gotas de ácido láctico distribuidas uniformemente en la superficie del medio de cultivo.

### 10.9.4. Aislamiento

La siembra se realiza con el fin de aislar o replicar los hongos para su uso inmediato o para mantenerlos viables por un tiempo corto. La siembra o aislamiento en cultivo puro consiste en dejar crecer el hongo elegido bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente. (Alcantara-Vargas et al., 2020)

Para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo y colocar una pizca del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un ansa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo. Generalmente para la siembra se usan placas, tubos y frascos. (Amerasan et al., 2016)

Después de la siembra se sellan las placas, tubos y frascos, se coloca la fecha y se incuba durante el tiempo conveniente hasta que se vea que el hongo ha crecido y está esporulando.

Los conidios se producen en un medio de agar papa-dextrosa (PDA) en placas Petri (9,0× 1,5 cm) durante 10-12 días en una cámara de crecimiento B.O.D. a temperatura 26 °C, RH > 60% y con 12 horas de fotofase. (Alcantara-Vargas et al., 2020)

Gráfico 7 Placa petri con conidios de *M. anisopliae*



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

Colonia de *M. anisopliae* CG168 en placas de Petri con medio PDA después de 10 días de incubación a 26 °C y 12 h de fotofase. (Alcantara-Vargas et al., 2020)

### 10.10. Protocolos de replicación.

De acuerdo a la búsqueda de información se pudo elaborar un protocolo sencillo que puede ser replicado en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi

#### 10.10.1. Recolección de muestras en el campo

Para la obtención de cepas del entomopatógeno se hacen recolecciones en el campo de insectos muertos que presenten síntomas o signos del patógeno que se desea aislar (micelio o esporulación). Estos insectos se colocan individualmente en frascos de vidrio, cajitas o fundas plásticas, limpias o esterilizadas, y se trasladan al laboratorio. Aquí se hace una desinfección de los especímenes, sumergiendo en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, durante 2 minutos, y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril (ADE). Posteriormente se colocan sobre papel filtro estéril para extraer el exceso de humedad. Una vez desinfectados los especímenes, se colocan en cajas petri acondicionadas como cámara húmeda estériles, con papel filtro, una bolita de algodón humedecido y dos portaobjetos colocados en cruz, sobre los cuales se colocan los especímenes desinfectados.

Gráfico 8 Gráficos de captura de insectos con conidios de *M anisopliae*



(A), crecimiento de micelio



(B) y esporulación de *M. anisopliae*



(C) sobre adultos de *Perkinsiella saccharicida*

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

### 10.10.2. Aislamiento

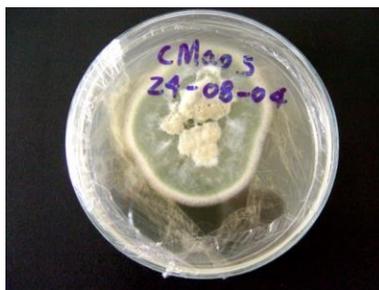
Para los aislamientos se toman los insectos de la cámara húmeda que presenten una esporulación uniforme y estén libres de contaminantes. Este aislamiento se puede efectuar de dos maneras: En el primer caso se prepara una suspensión retirando los conidios del cuerpo del insecto y colocándolos en un frasco. A partir de esta suspensión se hacen siembras en el medio de cultivo con la ayuda de un asa de platino. (Burns et al., 2013)

En el otro caso se retiran los conidios del insecto con el asa de platino y se siembran directamente utilizando la técnica del rayado sobre el medio de cultivo. El aislamiento se efectúa en cajas petri o tubos de ensayo conteniendo PDA (papa, dextrosa y agar) más extracto de levadura. Para evitar el crecimiento de bacterias se agrega una gota de ácido láctico sobre el medio de cultivo en cada caja petri o tubo de ensayo. Las cajas petri se sellan con parafilm y los tubos de ensayo con algodón y papel aluminio. Posteriormente se colocan en una incubadora a 27 °C con luz permanente. (Alcantara-Vargas et al., 2020, 2020; Tupe et al., 2017)

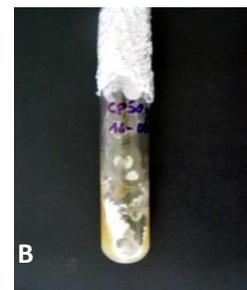
Gráfico 9 Colonización de *M. anisopliae*



Adulto de salivazo cubierto con micelio y conidias de *Metarhizium anisopliae*



Aislamientos de *M. anisopliae* en caja petri



Aislamientos de *M. anisopliae* en tubo de ensayo (B)

Fuente: (Benjamin et al., 2002)

### 10.10.3. Reactivación

Partiendo de una cepa seleccionada, sea nativa o introducida, es necesario mantener la patogenicidad y virulencia de este organismo a través de dos reactivaciones al año. Para esto se utilizan insectos vivos procedentes de la cría del laboratorio o del campo, que no muestren síntomas de afectación por algún patógeno.

El método de inoculación consiste en sumergir el insecto en una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidias/ml o pasar una pincelada en el dorso del mismo. Los insectos inoculados son colocados individualmente en cajas petri, proporcionándoles humedad y alimento hasta que se produzca la muerte del mismo. Posteriormente se colocan sobre papel filtro para eliminar el exceso de humedad y se transfieren a jaulas entomológicas en donde se las mantiene con pedazos de hojas de caña desinfectadas hasta que se produzca la muerte del insecto. Los insectos muertos son acondicionados en cámara húmeda (caja petri) como se indicó anteriormente, para que se produzca el desarrollo y la esporulación del hongo. (Dimbi et al., 2003)

#### 10.10.4. Producción del inóculo en cajas petri

Una vez obtenida la colonia pura del patógeno se prepara una suspensión de conidios y con la ayuda de un esparcidor o rastrillo de vidrio se siembran sobre el medio de cultivo (PDA más extracto de levadura). Las cajas petri se sellan con parafilm y se colocan en una incubadora a 27 °C, donde permanecen con luz continua durante 15 días, tiempo en el cual el hongo completa su desarrollo y alcanza a esporular completamente. Una vez esporulado el hongo, y mientras permanecen en la incubadora, se retira el parafilm de las cajas petri para que la colonia vaya perdiendo humedad y se mejore el intercambio gaseoso. Posteriormente, estas cajas pasan a la refrigeradora (4 a 8 °C) en donde pueden conservarse hasta seis meses. (Benjamin et al., 2002)

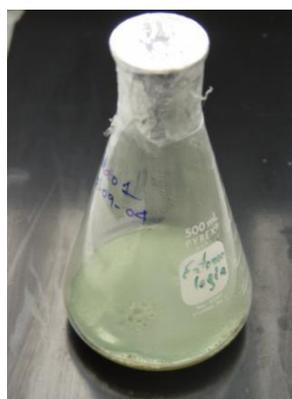
#### 10.10.5. Preparación de matrices

Para formar las matrices se utilizan Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de PDA más extracto de levadura y dos gotas de ácido láctico. En estas matrices se siembra el inóculo proveniente de las cajas petri llenas. Para ello se prepara una suspensión con una concentración de alrededor de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, de la cual se toman 2 ml para inocular cada matriz. Estas se colocan en la incubadora o en un ambiente a 27 °C, con luz permanente o fotoperiodo normal. Al cabo de 15 días el hongo estará completamente esporulado y podrá ser utilizado en la producción masiva del mismo. (Dimbi et al., 2013; Ferron, 1978)

Gráfico 10 Medios de preparación



Producción de inóculo en caja petri.



Matrices sólidas para producción de *M. anisopliae*

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

#### 10.10.6. Preparación del sustrato

Para la producción masiva del hongo se utiliza arroz precocido. Para preparar este sustrato se coloca el arroz en una olla con agua en estado de ebullición, por el lapso de 5 a 10 minutos. El arroz precocido debe mostrar una consistencia suave y que rompa con facilidad. Posteriormente, este

arroz es transferido a una zaranda para escurrir el exceso de humedad y enfriarlo. El arroz precocido se puede colocar en botellas de vidrio, fundas de polipropileno o tarrinas. Las fundas se cierran haciéndoles tres dobleces y sellándolas con grapas. El material así preparado, se esteriliza en autoclave a 121°C con 15 psi, durante 30 minutos. Después de esterilizar las fundas, se deben remover con el objeto de evitar aglomeraciones del arroz y facilitar el crecimiento del hongo. (Chelvi et al., 2011)

#### 10.10.7. Inoculación del sustrato

A partir de cada matriz sólida se prepara 500 ml de una suspensión de conidios del hongo, que puede tener una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml.

Para la inoculación del sustrato se utilizan 5 ml de esta suspensión por funda

Las fundas inoculadas se trasladan al cuarto de crecimiento, donde permanecen expuestas a un fotoperiodo normal y con una temperatura de 26 a 28 °C. Al tercer o cuarto día se remueve el contenido de las fundas para lograr un crecimiento uniforme y una buena esporulación. Al cabo de 15 días el sustrato con el hongo esporulado es trasladado al cuarto de secado. (Barajas et al., 2010)

Gráfico 11 Arroz inoculado con cepa de *M. anisopliae*



Fundas inoculadas en el cuarto de crecimiento y esporulación de *M. anisopliae*

Fuente: (Castro et al., 2016)

#### 10.10.8. Secado del producto

El sustrato con el hongo proveniente del cuarto de crecimiento se coloca en el cuarto de secado, a una temperatura no mayor de 28 °C, con baja humedad relativa (<70%) y sin entrada de rayos solares. Un cuarto con acondicionador de aire provee las condiciones adecuadas para el secado de este material. El material se esparce sobre papel periódico y sobre un plástico negro y estará listo para ser utilizado directamente en las aplicaciones en el campo o almacenarse en refrigeración (4 a 8°C). En este último caso, el hongo puede permanecer viable hasta por 6 meses.

## 11. IMPACTOS (Técnicos, sociales, ambientales o económicos)

- Este proyecto presenta un impacto positivo, ya que proporciona información a la comunidad científica, a profesionales, agricultores y estudiantes interesados, en las nuevas propuestas de control de plagas.
- Da a conocer estudios acerca de microorganismo e implementarlos en campo ayudando a los profesionales que buscan información referente al tema.

## 12. PRESUPUESTO

RECURSO	CANTIDAD	UNIDAD	PRECIOO UNITARIO	VALOR TOTAL
Alquiler computador	20	Hora/mes	0,50	30,00
Impresión	60	Hojas	0,05	3,00
Hojas de papel	80	Paquete	2,50	2,50
Empastado	1	Unidad	7,00	7,00
USB	1	Equipo	10,00	10,00
<b>TOTAL</b>				<b>52,50</b>

## 13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 13.1. Conclusiones

- La bibliografía recolectada fue de 330 documentos en donde hacen referencia a la temática de estadio, encontrando 56 documentos que hace referencia sobre métodos de captura, 40 documentos que trata de métodos de Aislamiento y 71 documentos que rige a métodos de Propagación y un total de 163 documentos que contiene dos o tres temas (captura, aislamiento y propagación).
- Mediante una adecuada revisión bibliográfica basada en información sistematizada se logró obtener una base de datos con información importante la misma que permitió establecer un manual de los métodos de captura, aislamiento y propagación.

### 13.2. Recomendaciones

- En la revisión bibliográfica se debe utilizar palabras claves tanto en idioma español como en inglés, permite que la búsqueda sea más factible y encontrar los documentos que sean necesarios.
- El uso del Gestor Bibliográfico Zotero permite gestionar las referencias y citas bibliográficas de forma libre, abierta y gratuita. El gestor bibliográfico ayuda a clasificar y realizar anotaciones a cada documento almacenado.
- Dar un manejo adecuado al manual de métodos de captura, aislamiento y propagación de *Metarhizium anisopliae*, que se realizó en esta revisión bibliografía

#### 14. BIBLIOGRAFIA

- A. Hussein, K., H. A. Hassan, S., & Ho Joo, J. (2011). Potential capacity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(6), 347-355. <https://doi.org/10.2323/jgam.57.347>
- Abawi, G. S., & Widmer, T. L. (2000). Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00070-6)
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 76-81. <https://doi.org/10.7550/rmb.33649>
- Albuquerque, A. C., Pereira, K. C. A., Cunha, F. M., Veiga, A. F. S. L., Athayde, A. C. R., & Lima, E. A. L. A. (2005). Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). *Neotropical Entomology*, 34, 585-591. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000400008>
- 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>
- Amerasan, D., Nataraj, T., Murugan, K., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Nicoletti, M., & Benelli, G. (2016). Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Metarhizium anisopliae* against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae). *Journal of Pest Science*, 89(1), 249-256. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0675-x>
- Anu Eskelinen. (2009). *Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats* | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00442-009-1362-5>
- Ashraf, M., Farooq, M., Shakeel, M., Din, N., Hussain, S., Saeed, N., Shakeel, Q., & Rajput, N. A. (2017). Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and

- sporulation of the stored grain insect pests. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 28165-28174. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0383-6>
- Ayala-Zermeño, M. A., Gallou, A., Berlanga-Padilla, A. M., Serna-Domínguez, M. G., Arredondo-Bernal, H. C., & Montesinos-Matías, R. (2015). Characterisation of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10), 1192-1207. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1041878>
- Barajas, C. G., del Pozo, E. M., García, I., & Méndez, A. (2010). OBTENCIÓN DE CONIDIOS DEL AISLAMIENTO MA-002 DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN MEDIANTE UNA ALTERNATIVA DE CULTIVO BIFÁSICO. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 174-180. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1010-27522010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt)
- Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B., & Ranjard, L. (2009). Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 262-275. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.024>
- Bender, S. F., Wagg, C., & van der Heijden, M. G. A. (2016). An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(6), 440-452. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.02.016>
- Benjamin, M. A., Zhioua, E., & Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and Field Evaluation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for Controlling Questing Adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 723-728. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.5.723>
- Boga, C., Vecchio, E., Forlani, L., & Franceschetti, M. (2014). Microbes to clean indoor pollutants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 429-434. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0465-3>
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., & Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216-234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>

- Butt, T. M., Ibrahim, L., Ball, B. V., & Clark, S. J. (1994). Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontrol Science and Technology*, 4(2), 207-214. <https://doi.org/10.1080/09583159409355328>
- Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., Moral, R. de A., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, I. (2016). Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.031>
- Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J., & Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(4), 355-367. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00145.x>
- Chávez, K. G. F., Navarro, S. R., Mayagoitia, J. F. C., & Florido, J. E. B. (2011). *Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas*. 18.
- Chelvi, C. T., Thilagaraj, W. R., & Nalini, R. (2011). *Field efficacy of formulations of microbial insecticide Metarhizium anisopliae (Hyphocreales: Clavicipitaceae) for the control of sugarcane white grub Holotrichia serrata F (Coleoptera :Scarabidae)*. *Journal of Biopesticides*, 4.
- Christine M Eisenhauer. (2010). *Deep Roots Support New Branches: The Impact of Dynamic, Cross-Generational Rural Culture on Older Women's Response to Formal Health Care | Online Journal of Rural Nursing and Health Care*. <https://rnojournals.binghamton.edu/index.php/RNO/article/view/73>
- Christopher B. Craft. (1997). *Relationships between Soil Nutrients and Plant Species Composition in Everglades Peatlands—Craft—1997—Journal of Environmental Quality—Wiley Online Library*. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq1997.00472425002600010032x>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2013). Horizontal Transmission of *Metarhizium anisopliae* in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. *Insects*, 4(2), 206-216. <https://doi.org/10.3390/insects4020206>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly

- species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera :Tephritidae). *Mycopathologia*, 156(4), 375-382.  
<https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000003579.48647.16>
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150.  
<https://doi.org/10.1017/S0953756299001756>
- Edwards, C. A., & Thompson, A. R. (1973). Pesticides and the soil fauna. En F. A. Gunther & J. D. Gunther (Eds.), *Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment* (pp. 1-79). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8493-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8493-3_1)
- Ferron, P. (1978). Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>
- Fungaro, M. H. P., Vieira, M. L. C., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. de. (1996). Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 389-392. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01186.x>
- Geisseler, D., & Scow, K. M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 75, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., & van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00054-8)
- Inglis, G. D., Duke, G. M., Goettel, M. S., & Kabaluk, J. T. (2008). Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(1), 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.12.001>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>

- Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2008). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18(8), 849-863.  
<https://doi.org/10.1080/09583150802381144>
- Jennifer B. Hughes Martiny. (2006). *Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map* | *Nature Reviews Microbiology*. <https://www.nature.com/articles/nrmicro1341>
- John W. Doran. (2000). *Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality—* *ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139300000676>
- Keller, S., Kessler, P., & Schweizer, C. (2003). Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, 48(3), 307-319. <https://doi.org/10.1023/A:1023646207455>
- Kristiansen, J. E., Hendricks, O., Delvin, T., Butterworth, T. S., Aagaard, L., Christensen, J. B., Flores, V. C., & Keyzer, H. (2007). Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm071>
- Lacey, L. A., Amaral, J. J., Coupland, J., Klein, M. G., & Simoes, A. M. (1995). Flight Activity of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) after Treatment with *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 5(2), 167-172. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1020>
- Levy, Y., & J. Ellis, T. (2006). A Systems Approach to Conduct an Effective Literature Review in Support of Information Systems Research. *Informing Science: The International Journal of an Emerging Transdiscipline*, 9, 181-212. <https://doi.org/10.28945/479>
- Luz, C., Tigano, M. S., Silva, I. G., Cordeiro, C. M., & Aljanabi, S. M. (1998). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(6), 839-846. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000600026>
- Madriz, L. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. [https://www.academia.edu/24117171/MANUAL\\_DE\\_LABORATORIO\\_PARA\\_EL\\_MANEJO\\_DE\\_HONGOS\\_ENTOMOPAT%C3%93GENOS?from=cover\\_page](https://www.academia.edu/24117171/MANUAL_DE_LABORATORIO_PARA_EL_MANEJO_DE_HONGOS_ENTOMOPAT%C3%93GENOS?from=cover_page)
- N. C. M. Gomes. (2001). *Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (Zea mays) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis* | *SpringerLink*.  
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010350406708>

- N. Eisenhauer. (2010). *Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis—Eisenhauer—2010—Ecology—Wiley Online Library.*  
<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1890/08-2338.1>
- Nayak, A. K., Gangwar, B., Shukla, A. K., Mazumdar, S. P., Kumar, A., Raja, R., Kumar, A., Kumar, V., Rai, P. K., & Mohan, U. (2012). Long-term effect of different integrated nutrient management on soil organic carbon and its fractions and sustainability of rice–wheat system in Indo Gangetic Plains of India. *Field Crops Research*, 127, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.11.011>
- Nicholson, P. S., & Hirsch, P. R. (1998). The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 551-558. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00381.x>
- Noah Fierer & Robert B. Jackson. (2005). *The diversity and biogeography of soil bacterial communities | PNAS.* <https://www.pnas.org/content/103/3/626>
- P. C. Brookes. (2006). *Detection and quantification of the soil microbial biomass – impacts on the management of agricultural soil.*  
[https://www.researchgate.net/publication/231781965\\_Detection\\_and\\_quantification\\_of\\_the\\_soil\\_microbial\\_biomass\\_-\\_impacts\\_on\\_the\\_management\\_of\\_agricultural\\_soil](https://www.researchgate.net/publication/231781965_Detection_and_quantification_of_the_soil_microbial_biomass_-_impacts_on_the_management_of_agricultural_soil)
- P. Garbeva. (2004). *MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness | Annual Review of Phytopathology.*  
<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Pablo Cuevas-Reyes. (2003). *Species richness of gall-forming insects in a tropical rain forest: Correlations with plant diversity and soil fertility | SpringerLink.*  
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022415907109>
- Quesada-Béjar, V. (2020). Pathogenicity of *Metarhizium* spp. On *Sphenarium purpurascens*1 in Central Mexico. *Southwestern Entomologist*, 45(1), 57. <https://doi.org/10.3958/059.045.0106>
- San Andrés, V., Ayala, I., Abad, M. C., Primo, J., Castañera, P., & Moya, P. (2014). Laboratory evaluation of the compatibility of a new attractant contaminant device containing *Metarhizium anisopliae* with *Ceratitis capitata* sterile males. *Biological Control*, 72, 54-61.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.007>

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

SciELO Ayuda. (s. f.). Recuperado 9 de febrero de 2020, de [https://images.webofknowledge.com/WOKRS514B4/help/es\\_LA/SCIELO/hs\\_search\\_operators.html](https://images.webofknowledge.com/WOKRS514B4/help/es_LA/SCIELO/hs_search_operators.html)

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

Simu & Hagström. (2004). *Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis—Boström—2004—Limnology and Oceanography: Methods—Wiley Online Library*. <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lom.2004.2.365>

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

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

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

Tupe, S. G., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). Development of *Metarhizium anisopliae* as a Mycoinsecticide: From Isolation to Field Performance. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 125, 55272. <https://doi.org/10.3791/55272>

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

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

Zimmermann, G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(1), 36-40.

[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90034-9)

Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375-379. <https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>

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

## 15. ANEXOS

## Anexo No. 1 Aval del Traductor



## ***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: **“REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE PROTOCOLOS DE MANEJO DE BIOCONTROLADORES (*Metarhizium anisopliae*). EN SU CAPTURA, AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN SALACHE-CEYPSA 2021”** presentado por: **Denisse Nathalia Negrete Cueva**, egresada de la Carrera de: **Ingeniería Agronómica**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

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

Latacunga, Agosto del 2021

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lidia Rebeca Yugla Lema', is written over a horizontal line.

**Mg. Lidia Rebeca Yugla Lema**  
**DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS**  
**C.C. 0502652340**



**CENTRO**  
**DE IDIOMAS**

## Anexo No. 2 Base de datos en software Excel.

Clave	Tipo	Año de publicación	Autor	Título	Revista	Idioma	País	Captura	Aislamiento	Propagación	Link
L7GN7Y5L	Journal Article	2020	Alcantara-Vargas, Erik; Espitia-López, Josefa; Garza-	Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género <i>Metarhizium anisopliae</i> , aislados en zonas agrícolas del	Revista mexicana de biodiversidad	es	México	x			<a href="http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&amp;pid=S1870-34532020000100702&amp;lng=es&amp;nrm=iso&amp;tlng=es">http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&amp;pid=S1870-34532020000100702&amp;lng=es&amp;nrm=iso&amp;tlng=es</a>
ALW9BJDV	Journal Article	2007	Zimmermann, Gisbert	Review on safety of the entomopathogenic fungus <i>Metarhizium anisopliae</i>	Biocontrol Science and Technology	en	Brasil		x		<a href="https://www.worldcat.org/wcpa/journaltitle/Biocontrol+Science+and+Technology">https://www.worldcat.org/wcpa/journaltitle/Biocontrol+Science+and+Technology</a>
DM48TQV	Journal Article	2021	Guigón-López, César; Holguín-Ibarra, Paulina Dayanara;	<i>Metarhizium anisopliae</i> reduces conidial germination and mycelium growth of the apple gray mold <i>Botrytis cinerea</i>	Biological Control	en	México	x			<a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964421001304">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964421001304</a>
8BCNDX3T	Journal Article	2010	Asi, Muhammad Ramzan; Bashir, Muhammad Hamid;	COMPATIBILITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI, <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> AND <i>PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS</i> WITH SELECTIVE INSECTICIDES	Department of Agri. Entomology, University of Agriculture, Faisalabad-Pakistan	en	Pakistan			x	<a href="http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(6)/PJ842(6)4207.pdf">http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(6)/PJ842(6)4207.pdf</a>
YAILIS2H	Journal Article	2014	Sajap, AS; Rozihawati, Z; Omar, D; Lau, WH	<i>ISARIA FUMOSOROSEA</i> AND <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> FOR CONTROLLING <i>ATTEVA SCIODOXIA</i> (LEPIDOPTERA: YPONOMEUTIDAE), A PEST OF <i>EURYCOMA LONGIFOLIA</i>	Journal of Tropical Forest Science	en	Malasia		x		<a href="https://www.jstor.org/stable/23617017">https://www.jstor.org/stable/23617017</a>

## Anexo No. 3 Informe de anti plagio.



### Document Information

Analyzed document	Tesis Final (1).docx (D111193129)
Submitted	8/12/2021 4:27:00 AM
Submitted by	CHANCUSIG ESPIN EDWIN MARCELO
Submitter email	edwin.chancusig@utc.edu.ec
Similarity	7%
Analysis address	edwin.chancusig.utc@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://1library.co/document/zpn6xx4y-determinacion-plaguicidas-microorganismos-beneficos-potencial-recuperacion-agricolas-laboratorio.html">https://1library.co/document/zpn6xx4y-determinacion-plaguicidas-microorganismos-beneficos-potencial-recuperacion-agricolas-laboratorio.html</a> Fetched: 8/12/2021 4:28:00 AM	1
<b>W</b>	URL: <a href="http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf">http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf</a> Fetched: 11/14/2020 9:01:01 AM	2
<b>W</b>	URL: <a href="https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Producci%C3%B3n-Metarhizium-anisopliae-Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B05.pdf">https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Producci%C3%B3n-Metarhizium-anisopliae-Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B05.pdf</a> Fetched: 1/22/2020 6:23:57 PM	5
<b>SA</b>	<b>UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI / PROYECTO_CHAVEZ_DANIELA.docx</b> Document PROYECTO_CHAVEZ_DANIELA.docx (D111047899) Submitted by: nelly.deleg@utc.edu.ec Receiver: nelly.deleg.utc@analysis.orkund.com	2
<b>SA</b>	<b>Tesis_VeraVillalva.docx</b> Document Tesis_VeraVillalva.docx (D23359676)	8

## Anexo No. 4 Manual de Producción de *Metarhizium anisopliae*



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE  
COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

MANUAL DE PRODUCCIÓN DE (*Metarhizium anisopliae*)

**Autora:** Denisse Negrete

**Colaboradores científicos:**

Ing. Ph.D. Edwin Chancusig.  
Ing. Mg. Klever Quimbiulco.  
Ing. M.Sc. Giovanna Parra.  
Ing. Mg. David Carrera.

TEMA

Pag

1. INTRODUCCION .....	3
2. HONGOS ENTOMOPATOGENOS .....	3
2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	3
3. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos ...	4
3.1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto .....	4
3.2. Germinación de la conidia .....	4
3.3. Penetración del integumento .....	4
3.4. Multiplicación del hongo en el hemocele .....	5
3.5. Producción de toxinas .....	5
3.6. Muerte del insecto .....	5
3.7. Colonización .....	6
3.8. Emergencia .....	6
3.9. Esporulación .....	6
3.10. Diseminación .....	6
4. Captura y Aislamiento .....	7



**UNIVERSIDAD**

**TÉCNICA DE**

**COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**Título:**

**MANUAL DE PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae***

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Ingeniera Agrónoma

**Autora:**

Denisse Negrete

**Colaboradores científicos:**

Edwin Chancusig Espín. Ing. Ph.D.

Klever Quimbiulco Sanchez. Ing. Mg.

Giovanna Parra Gallardo. Ing. M.Sc.

David Carrera Molina. Ing. Mg.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Agosto 2021**

TEMA	Pag
1. INTRODUCCION.....	1
2. HONGOS ENTOMOPATOGENOS .....	1
2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	1
3. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos .....	1
3.1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto.....	2

3.2. Germinación de la conidia.....	2
3.3. Penetración del integumento.....	2
3.4. Multiplicación del hongo en el hemocele.....	2
3.5. Producción de toxinas.....	2
3.6. Muerte del insecto .....	3
3.7. Colonización.....	3
3.8. Emergencia.....	3
3.9. Esporulación.....	3
3.10. Diseminación.....	4
4. Captura y Aislamiento.....	4
4.1. Aislamiento <i>M. anisopliae</i> .....	4
4.2. Aislamiento directo.....	5
4.3. Preparación de la cámara húmeda.....	5
4.4. Cultivo monoespórico.....	6
4.5. Cepario de conservación.....	6
4.6. Conservación en Sílica Gel.....	6
4.7. Cultivos puros .....	7
5. PRODUCCIÓN .....	7
Reactivación de la cepa .....	7
5.1. Primera fase.....	7
5.1.1. Preparación del medio líquido .....	7
5.1.2. Inoculación e incubación del medio líquido. (Frascos Erlenmeyer) .....	8
5.1.3. Biofermentador .....	8
5.2. Segunda fase .....	9
5.2.1. Preparación del sustrato .....	9
5.2.2. Inoculación del sustrato con el medio líquido de frascos erlenmeyer .....	9
5.2.3. Incubación del sustrato.....	10
5.2.4. Incubación .....	10
5.2.5. Pase del arroz a bandejas .....	10
5.2.6. Extracción de conidias .....	10
5.3. Cosecha del hongo entomopatógeno seco.....	10
6. CONTAMINANTES.....	11
7. Control de calidad del producto final.....	12
8. Cámara de Neubauer .....	13
9. BIBLIOGRAFÍA.....	13

ANEXO .....	19
Agar - Agua ( AA).....	19
Papa - Dextrosa - Agar ( PDA).....	19
Papa – Dextrosa - Agar Levadura de Cerveza (PDA-LC).....	20
Sabouraud Dextrose Agar (SDA).....	20
Solución antibiótica.....	21
Papa Dextrosa Levadura de cerveza (PDL).....	21
MEDIOS DE MONTAJE.....	21
Azul de lactofenol.....	21
Solución de Tween al 0,1%.....	22
CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SILICA GEL.....	22
Manual de Producción de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	23

## 1. INTRODUCCION

El desarrollo de metodologías claras es esencial para la multiplicación de los microorganismos benéficos y en este caso la producción de *Metarhizium anisopliae*. Que es un hongo entomopatógeno reproducido desde los años 70 como agente de control. (Alejandro Rodríguez, 1999).

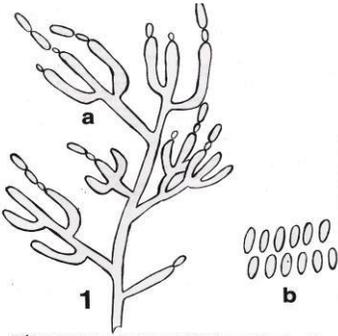
Además de eso pueden atacar en diversas fases de desarrollo del insecto, siendo el mecanismo de infección por penetración de tegumento, diferente de bacterias y virus cuya infección es exclusivamente por ingestión (Doberski & Tribe, 1980) Siempre y cuando las condiciones de temperatura y humedad relativa sean adecuadas.

El objetivo de esta investigación fue la búsqueda de información adecuada para la captura aislamiento y propagación de *M. anisopliae*.

## 2. HONGOS ENTOMOPATOGENOS

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, encontrándose presentes en forma natural en el medio ambiente, en el suelo, en restos de cultivos, sobre los cadáveres de insectos, obteniendo su nutrición de otros organismos o de materia orgánica. (Maniania, 2002)

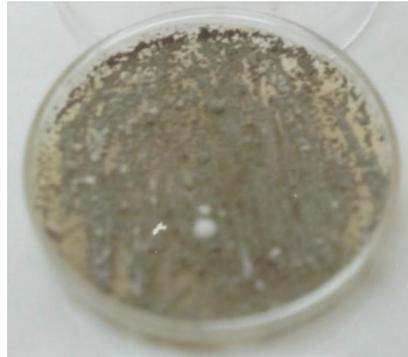
### 2.1. *Metarhizium anisopliae*



a) Fialide

b) Conidia

FIGURA 1.: *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. a. conidioforos, b. conidias



olor verde que  
a amarillo-

Presentan conidioforo ramificado, conidias cilíndricas a ovals que se forman en cadenas originadas en fialides. Las conidias son producidas en sucesión basipétala, estando la conidia más joven en la base de la cadena. Las conidias son blancas cuando son jóvenes, pero conforme maduran toman el color verde oscuro característico de esta especie. (Maniania, 2002)

## 3. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los hongos entomopatógenos y los insectos. En general la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados

infectan al hospedante a través de la cutícula. El contacto entre la unidad infectiva del entomopatógeno y el insecto es indispensable para el inicio del proceso infeccioso. (Bischoff et al., 2009; Freed et al., 2011)

Las etapas en el desarrollo de la micosis son:

### **3.1. Adhesión de la conidia a la cutícula del insecto**

Es el contacto de la unidad infectiva del hongo o conidia con la superficie del insecto. Las responsables de esta unión son las características físicas y químicas de las superficies tanto de la conidia como de la superficie del insecto. En algunos hongos la adhesión es un proceso no específico, mientras que en otros es un proceso específico. En este proceso participan algunas glicoproteínas que sirven como un receptor específico para las conidias. Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas. (Bautista-Galvez et al., 2012)

### **3.2. Germinación de la conidia**

Es el proceso mediante el cual, la conidia o espora sobre el integumento del insecto, germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio con el cual se fija en la cutícula. El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos no llega a formarse. El tiempo de germinación dependiendo de la cepa es de 12 a 20 horas. (Hernandez et al., 2007)

### **3.3. Penetración del integumento**

La penetración de la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. En este proceso participa un mecanismo físico y otro químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasa y quitinasas, las cuales degradan el tejido de la zona de penetración, lo que facilita la penetración física. El tiempo de penetración es de 8 a 12 horas. (Castro et al., 2016)

### **3.4. Multiplicación del hongo en el hemocele**

Una vez que el hongo llega al hemocele, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamados blastosporas. (G. García, 2004)

### **3.5. Producción de toxinas**

Los hongos producen toxinas que matan al insecto, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas y matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicas para artrópodos, causando la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, produciendo la degeneración de los tejidos producto de la pérdida de integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido, además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del insecto. Las toxinas producidas pueden ser enzimas, las cuales son secretadas en cantidades significativas tanto en el cuerpo del insecto como en medios de cultivo (lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas), o metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pudiendo ser afectada por diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, etc. (Oulevey et al., 2009)



Fuente: (Kabaluk & Ericsson, 2007) Insecto micotizado.

### **3.6. Muerte del insecto**

La muerte del insecto infectado, ocurre generalmente antes de que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto, debido en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la fase saprofítica. (Hernandez et al., 2007) El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales. (Madriz, 2004)

### **3.7. Colonización**

Una vez muerto el insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos. Después de la colonización, en la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia, también puede presentarse el cambio de color en el cadáver del insecto. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo (Mnyone et al., 2009)

### **3.8. Emergencia**

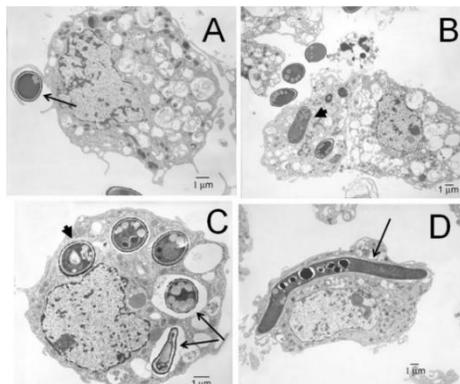
Después de muerto el insecto, si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, ( $\geq$  a 90%) el hongo emerge al exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones externas no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde puede sobrevivir por algunos meses, hasta que lleguen las condiciones favorables para su esporulación. (Sasan & Bidochka, 2013)

### **3.9. Esporulación**

Cuando las hifas emergen al exterior y si las condiciones de humedad relativa son favorables, ocurre la producción de conidios o esporas en un período de 24 a 48 horas. En esta fase el insecto muerto adquiere la coloración característica del hongo involucrado.

### 3.10. Diseminación

Las conidias o esporas del hongo que son las unidades infectivas se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre, buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. La dispersión puede ser un proceso activo o pasivo, dependiendo de las características de la conidia y del esporangio. (Sasan & Bidochka, 2013)



Fuente: (Pattemore et al., 2014) Imágenes TEM (microscopía electrónica de transmisión) de la internalización de conidios de *M. anisopliae* en garrapatas. (A) 10 minutos de infección. (B) 30 minutos; una célula fúngica sin membrana circundante clara. (C) 2 h; las flechas grandes indican células fúngicas en grandes vacuolas. (D) 16 h; corte transversal de un conidio germinado dentro de una célula de garrapata.

## 4. Captura y Aislamiento

La utilización de productos a base de hongos entomopatógenos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos biológicos de alta eficiencia en la reducción de las plagas para las cuales se están utilizando. Para la obtención de estos productos biológicos se requiere producir estos hongos entomopatógenos, el cual consiste en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conidias) en un sustrato natural. A la fecha se han evaluado diferentes sustratos como arroz, trigo, cebada, maíz, frijol y soya, siendo los que más se utilizan el arroz y el maíz. (Sasan & Bidochka, 2013)

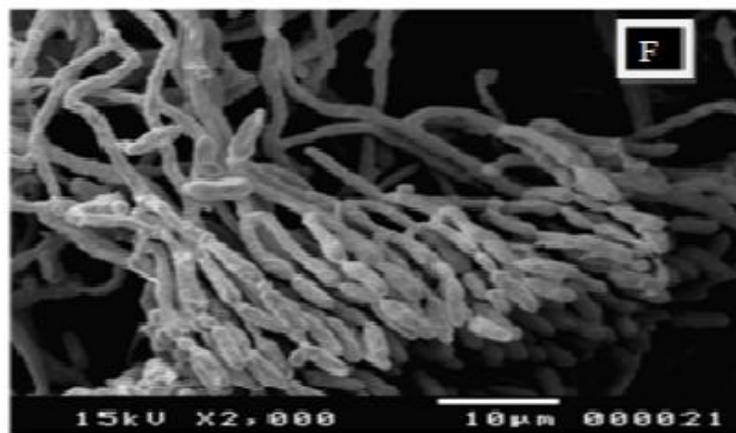


Fuente: (Madriz, 2004) Aislamiento de *M. anisopliae* en caja petri y tubo de ensayo

### 4.1. Aislamiento *M. anisopliae*

Es la obtención del hongo a partir de insectos infectados, en medios artificiales como PDA (tubos de ensayo o placas de Petri), o conservados en Silica Gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a su inoculación en un medio de cultivo para la obtención de cultivos puros. El aislamiento del hongo es el

paso inicial del proceso de producción, por lo que se debe estar seguro de haber aislado el hongo correspondiente a nuestra producción, así como estar libres de contaminantes y tener un buen desarrollo. (Hernandez et al., 2007)



Fuente: (Bischoff et al., 2009) Fotografía de microscopio electrónico de barrido de *M. anisopliae*.

#### 4.2. Aislamiento directo

Consiste en la obtención directa del hongo a partir del insecto esporulado. Esta técnica no es muy ventajosa, debido a que las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y acarrear problemas de contaminación en el aislamiento, siendo aconsejable, coger cuidadosamente con un asa en punta una porción pequeña del hongo, sin tocar el cuerpo del insecto y sembrarla en medio de cultivo. (Oulevey et al., 2009)

Este proceso debe hacerse bajo un estereoscopio. Cuando en el insecto no se observan las estructuras del hongo se pone en cámara húmeda para estimular el desarrollo del hongo siendo más fácil su aislamiento. (Hernández-Rosas et al., 2019)

#### 4.3. Preparación de la cámara húmeda.

Se seleccionan insectos que no muestren signos de contaminación, o que se presenten sucios, para desinfectarlos se sumerge a los insectos de 10 segundos a 3 minutos en hipoclorito de sodio al 0.05 % (dependiendo del tamaño o tipo de insecto), se enjuaga tres veces en agua destilada estéril y se ponen sobre un papel toalla para eliminar el exceso de agua. Los insectos desinfectados se ponen en una cámara húmeda, que consiste en una placa de Petri estéril, en donde se coloca al insecto y a un costado se pone un algodón embebido en agua estéril, se sella con cinta parafilm e incuban durante 5 a 10 días a temperatura ambiente. (Alvarez et al., 2015)

Las cámaras húmedas preparadas, se revisan a partir del quinto día observando al estereoscopio los insectos esporulados, con la ayuda de un asa de siembra se toma una muestra del hongo y se coloca sobre una lámina porta objeto con una gota de azul de lacto fenol, se extiende la muestra y se coloca un cubre objeto, observando el preparado al microscopio, una vez confirmada la especie que se desea aislar, se procede a sembrar el hongo por puntura en placas de Petri con medio de cultivo SDA acidificado o con antibiótico, a partir del mejor insecto esporulado. Incubar las placas preparadas durante 5 a 10 días a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. (Alvarez et al., 2015)



Fuente: (Madriz, 2004) Cámara húmeda A: crecimiento de micelio B: esporulación de *M. anisopliae* C: *M. anisopliae* a 24 horas de proceso de esporulación.

#### 4.4. Cultivo monoespórico

Un aislamiento monoespórico es aquel que se obtiene a partir de una espora con un contenido genómico único, que corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula individual, con la finalidad de minimizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos en producción. (G. García, 2004)

Con el asa de siembra se extraen esporas de una placa, se siembran en 10 ml de Tween 20 al 0.1% y se realizan diluciones hasta obtener la dilución 10<sup>-2</sup>. (G. García, 2004)

Las placas con medio de cultivo que se utilizarán para el cultivo monoespórico, se preparan marcando unas líneas guía en forma de W en el reverso de la placa con el fin de facilitar la lectura en el microscopio. Se toma una gota de la dilución con un asa de siembra en aro y se deposita en el extremo superior de la estría, arrastrando la gota por la estría dibujada, cuidando de no levantar el asa de siembra. Las placas preparadas se incuban durante 24 horas a 25 ± 2 °C. Con la ayuda de un microscopio se ubica una espora germinada se corta el bloque de agar que contiene la espora y se lleva a un medio nutritivo con antibiótico, llevar a incubar a 25 ± 2 °C por 8 a 10 días, al cabo de este tiempo se seleccionan las colonias monoespóricas sin contaminantes y que presenten las características típicas del hongo sembrado. Los cultivos monoespóricos se conservan a 5 °C utilizándolos cuando sean convenientes. (Albert et al., 2007)

#### 4.5. Ceparío de conservación

En el laboratorio, se debe mantener un ceparío de conservación y otro de producción.

Las cepas o aislamientos procedentes de monocultivos, se conservan en viales o tubos con PDA o PZA a 5 a 9 °C: Otra modalidad de conservación de cepas es en sílica Gel (color anaranjado) se fechan, anotándose el código del aislamiento. (Jacoby et al., 2017)

#### 4.6. Conservación en Sílica Gel

En una ficha aparte se anotará el nombre del patógeno, nombre de la persona que efectuó el aislamiento, lugar, fecha, colector, medio de cultivo utilizado y otros datos de interés. (Hernandez et al., 2007)

El “ceparío de conservación” es del primer pase del hongo. Si la conservación es en tubos con medio de cultivo, una vez desarrollado el hongo se guardan en refrigeración a temperatura de 4° C, asegurando de

esta forma una conservación hasta por un año, en que se realizará el pase a nuevos tubos, si se observa que el medio se ha secado.(Schinner et al., 2012)

Las contaminaciones ocurren con frecuencia, incluso en tubos cuidadosamente taponeados, por tanto, es necesaria la asepsia para los trabajos microbiológicos en la siembra e inoculación. (Silva et al., 2011)

Cuando se realiza un gran número de pases a medios de cultivo, ocurren cambios en las características del hongo, produciéndose también estos cambios cuando se someten a condiciones no adecuadas de pH, temperatura o cuando alguna sustancia o componente no adecuado son usados en el medio de cultivo. El pH debe oscilar entre 5 y 6. Si las cepas se conservan en tubos con medio de cultivo, no deben conservarse por más de 3 meses en refrigeración.(Silva et al., 2011)

#### **4.7. Cultivos puros**

Un cultivo puro es aquel en que está presente únicamente el hongo de interés sin ningún tipo de contaminantes. Los cultivos puros se obtienen a partir del reislamiento del hongo a partir del cepario de producción, el cual es sembrado en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA o SDA. El cultivo puro es la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción y es utilizado para inocular los medios líquidos.(Jaramillo et al., 2015)

### **5. PRODUCCIÓN**

#### **Reactivación de la cepa**

La reactivación del carácter de virulencia, se logra realizando los pases por su hospedante original, para lo cual se utilizan insectos de crianza en laboratorio, pudiendo utilizarse también otros insectos por su facilidad de crianza en laboratorio como *Galleria mellonella*. La reactivación se puede realizar mediante dos métodos, uno asperjando los insectos con una solución de esporas de una concentración conocida y el segundo sumergiendo los insectos en la solución de esporas. Para ambos métodos los insectos se tienen que esterilizar en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuagar por tres veces en agua destilada estéril, poner sobre un papel toalla estéril para eliminar el exceso de humedad, y asperjar los insectos o sumergirlos en la solución de esporas, acondicionándolos luego en una cámara húmeda. Incubar a  $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$  y revisar a partir del tercer día retirando los insectos que muestren signos de infección. Los insectos que presenten mayor esporulación en menor tiempo serán utilizados para la reactivación del cepario.(Francis, 2019)

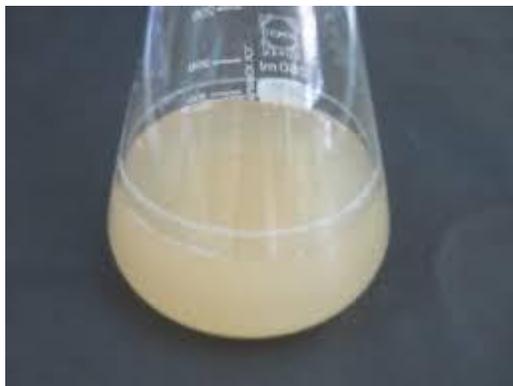
La producción masiva de los hongos entomopatógenos se realiza en dos métodos: uno en bolsas y otro en bandejas. En ambos métodos es secado para su comercialización. La concentración de esporas o conidias es 10 veces más que por el método en bandeja que el de bolsa. La producción se realizará en dos fases:

#### **5.1. Primera fase**

##### **5.1.1. Preparación del medio líquido**

El más común es el PD, PG (Papa Dextrosa, Papa Glucosa). Estos medios pueden prepararse en frascos erlenmeyer o matraces a razón de 700 ml por frasco de 1000 ml, se cubren con papel aluminio y se esteriliza a  $121^{\circ} \text{C}$  y 15 lbs (1 atm) de presión por 20 minutos.(Sasan & Bidochka, 2013)

Otra forma de preparar el medio líquido es en biofermentadores de 20 litros, se preparan 15 litros de medio, se esterilizan en una autoclave por una hora a 121 °C y 15 lbs de presión. La esterilización se realiza con los filtros, cerrando las mangueras con una pinza antes de los filtros para evitar que se mojen al momento de la esterilización. (Ghayedi & Abdollahi, 2013)



*Fuente: (Anbesse et al., 2008)*

### **5.1.2. Inoculación e incubación del medio líquido.** (Frascos Erlenmeyer)

Una vez fríos los medios líquidos, se llevan a la cámara de flujo laminar y se le agrega aproximadamente 0.1 g de cloranfenicol a granel. Se selecciona la mejor placa previamente analizada, es decir libre de contaminación, buena esporulación y morfología microscópica típica. Se agrega 10 ml de agua destilada estéril más Tween y con la ayuda de una espátula o una cucharilla flameada y enfriada con alcohol, se raspa suavemente la superficie de la placa, para soltar las esporas o conidias, se agrega 10 ml de agua destilada estéril más Tween, con una pipeta estéril se toma 5 ml de la solución y se agrega al medio líquido frío. También otra forma de inocular el medio líquido es cortar el agar y agregar un cuarto de placa por frasco de medio líquido. Terminada la siembra se cierran con su respectiva tapa estéril de papel aluminio, se cubre finalmente con cinta parafilm y se llevan a un agitador orbital a 160 rpm por 3 días a la temperatura de 24 a 28 °C. (Silva et al., 2011)

### **5.1.3. Biofermentador**

Una vez frío el biofermentador, se lleva a la cámara de flujo laminar y se le agrega 1 ml de ácido láctico por litro de medio y 0.1 g de antibiótico por litro (cloranfenicol o sulfato de estreptomina) y se inocula con una solución de esporas que se obtiene de una placa esporulada, la cual se prepara del mismo modo que para los frascos erlenmeyer. Se agrega todo el contenido de la placa. Una vez inoculado se quitan las pinzas y a la manguera de uno de los filtros se le coloca un motor de pecera para su agitación por 3 días, a temperatura de 24 a 28 °C. (Ghayedi & Abdollahi, 2013)



Fuente: (Madriz, 2004) biofermentador líquido

## 5.2. Segunda fase

### 5.2.1. Preparación del sustrato

La preparación del sustrato para *Metarhizium anisopliae*: 800 g de arroz y 200 ml de agua.

Una vez llenadas las bolsas de polipropileno, se engrapan los extremos de la bolsa previo doblar de la bolsa y se esteriliza en autoclave: 121 °C, 15 Lb de presión (1 Atmosfera), por 30 minutos, El tiempo de esterilización está en relación conforme aumente la cantidad de bolsas (hasta 45 min con la autoclave convencional). (Ferron, 1978)

En un área desinfectada se procede a descompactar el arroz, para que no se formen grumos. Las bolsas se dejan enfriar y antes de continuar con el paso siguiente de la inoculación del sustrato se debe esterilizar, nuevamente, el ambiente donde se dejaron enfriar las bolsas. (Emplear lámparas de luz ultravioleta durante 1 hora, desconectar, e ingresar a partir de 30 minutos aproximadamente). (Chandler, 1997)

### 5.2.2. Inoculación del sustrato con el medio líquido de frascos erlenmeyer

Una vez frías, las bolsas con el arroz se llevan a la cámara de flujo laminar, se desinfecta el borde de cada bolsa con un algodón embebido en alcohol, se abre cuidadosamente la bolsa y se inocula con 30 ml del caldo líquido agitado. Con un frasco de medio preparado se inoculan 20 bolsas. Se cierra nuevamente la bolsa y se agita para homogenizar el inóculo con el sustrato. (Lomer et al., 2001)



Fuente: (Madriz, 2004)

### **5.2.3. Incubación del sustrato**

Al medio líquido agitado durante los 3 días, se le agrega nuevamente con ayuda de una espátula aproximadamente 0.1 gramo de antibiótico cloranfenicol, agitar y agregar agua destilada estéril hasta completar 1 litro. La inoculación de las bolsas se realiza agregando 50 ml de medio líquido por bolsa. Luego se deben agitar las bolsas y llevarlas a incubación. (Lomer et al., 2001)

### **5.2.4. Incubación**

Las bolsas preparadas se incuban por 48 horas a una temperatura de 24 a 28 °C, luego se seleccionan las bolsas que presentan un buen desarrollo micelial y libres de contaminantes.

Con una tijera desinfectada con alcohol se cortan las bolsas por debajo de las grapas y se pasa el arroz con el hongo a bandejas que han sido previamente desinfectadas para lo cual las bandejas se limpian y humedecen con alcohol y se flamean con el mechero. Se extiende el arroz en las bandejas, para favorecer la colonización y esporulación del hongo y se dejan en incubación a 27 °C y 80% HR por 5 días. (Hernandez et al., 2007)

### **5.2.5. Pase del arroz a bandejas**

Una vez que el hongo ha esporulado cubriendo toda la bandeja, se realiza su secado a temperaturas bajas por un periodo de 5 a 6 días, tiempo suficiente para bajar la humedad del arroz a 15% de humedad. El área de secado cuenta con aire acondicionado y se realiza ajustando la temperatura en 16 °- 20 °C. (Pilz, 2008)

### **5.2.6. Extracción de conidias**

Consiste en separar del arroz las conidias del hongo y recolectarlas para su posterior formulación. La cosecha extracción de conidias puede realizarse en equipos mecánicos como el Mycoharvester o en forma manual utilizando tamices más frotación, en que se cosechan pequeñas cantidades con fines de ensayos. (Tiago et al., 2014)

La conidias cosechadas son afectadas por la luz, humedad y altas temperaturas, por lo que una vez cosechado el hongo debe conservarse en refrigeración a 4 °C, para mantener su viabilidad. (Tiago et al., 2014)

### **5.3. Cosecha del hongo entomopatígeno seco.**

El producto final es cosechado en bolsas, pesado a 800 g y sellado. El rendimiento de esporas por kilo está en función a la especie producida, pudiendo llegar a obtenerse concentraciones de  $4 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{14}$  con/k. (Asi et al., 2010)

Para la cosecha utilizar vestuario de bioseguridad, (careta de cara completa, mameluco cuerpo completo descartable o lavable)

Conservación del hongo entomopatígeno o producto final

En ambientes provistos de temperatura de 5 °C, el producto final conserva inalterables sus características por más tiempo. Y en temperaturas de 16 – 20°C por 3 meses. (Bautista-Galvez et al., 2012)

## 6. CONTAMINANTES

Uno de los aspectos más críticos de la producción masiva es asegurarse de que la contaminación del producto sea evitada a toda costa. Se considera contaminante a todo aquel tipo de microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio de cultivo del hongo entomopatógeno. Generalmente los contaminantes siempre están presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio y se presentan cuando no se cumplen las normas de trabajo en el laboratorio. Aún bajos niveles de contaminación de hongos contaminantes como *Aspergillus* o *Penicillium* spp., son completamente inaceptables en el producto final.(Barajas et al., 2010)

- Bacterias: Son los contaminantes más importantes en el proceso de producción masiva, de acuerdo a la especie presentan colonias redondeadas, translúcidas de coloración amarillenta, rosada o lechosa, desarrollando muy rápido en el medio de cultivo observándose al segundo día después de sembradas las placas. Estas bacterias desarrollan también en las bolsas sembradas, las que se despiden mal olor, descomponiéndose muy rápidamente. Las bacterias más comunes son los bacilos y cocos, encontrándose también levaduras.(Asi et al., 2010)
- Fusarium: Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran estas pueden ser: naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen dos tipos de conidias, macro y micro conidias.(Hernández-Rosas et al., 2019)
- Penicillium: Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en fialides o células fértiles productoras de conidias, conidias producidos basipetalamente y unidas en cadenas, los conidias son globosos a elípticos, lisos o equinulados.(J. García et al., 2011)
- Aspergillus: Es un hongo patógeno al hombre porque es cancerígeno, tiene conidióforos hialinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula conidias globosos a ovaes.(Zhang et al., 2018)
- Protozoarios: Estos microorganismos son difíciles de diagnosticar, pudiendo encontrarse infectando a nivel de cepa. Estos microorganismos tienen comportamiento hiperparasítico pues se alimentan de los hongos bajando el rendimiento.(Zhang et al., 2018)
- Ácaros: Los ácaros de los géneros *Tyrophagus* y *Tarsonemus*, son contaminantes comunes en todo laboratorio, estos invaden e infestan cultivos en tubos, placas de Petri. Se alimentan de los hongos y a menudo los infectan con diversas bacterias u otros contaminantes al deambular

desde un cultivo a otro. Los ácaros son atraídos por el aroma de los hongos, siendo transportados por insectos, plantas etc.(Zhang et al., 2018)

Si se observan en placas, tubos o bolsas, estas deben eliminarse inmediatamente en la autoclave, pues estos ácaros se diseminan muy rápidamente.

Para evitar el crecimiento de bacterias se le debe de agregar al medio un antibiótico como penicilina, cloranfenicol, estreptomina y regular el pH por medio de la adición de ácido láctico, cuando el daño por bacterias es elevado, es recomendable fumigar el lugar de trabajo con formalina o poner lámparas de luz ultravioleta que ayudan a eliminar las bacterias y hongos que se encuentran en el medio ambiente y esterilizar todo material que se utilice en el proceso de producción(Zhang et al., 2018)

Una forma de determinar la presencia de hongos y bacterias contaminantes, es poner placas de Petri con medio de cultivo SDA, abiertas dentro de la cámara de flujo laminar, sobre la superficie de las mesas, dentro de la incubadora, etc., estas placas se dejan por 30 minutos, luego se cierran y se incuban.(Jaramillo et al., 2015)

El mejor método de control para evitar los diversos tipos de organismos contaminantes es la asepsia e higiene general del laboratorio, limpiando diariamente los pisos mesas, estantes, así mismo la incubadora se debe desinfectar con alcohol 70 % y luego con luz UV durante 1 hora.(Oulevey et al., 2009)

### **7. Control de calidad del producto final**

Es el proceso por el cual se determina la calidad del producto final obtenido, registrando el número de conidias por gramo de sustrato, viabilidad y pureza.(Ferron, 1978)

Para que el biopreparado sea considerado de buena calidad, debe reunir ciertos parámetros establecidos por organismos encargados de regular la calidad de estos productos. Estos parámetros son:

- Concentración de conidias: Determinado según las características de conidiación del hongo y en el método que se emplee para producirlo.
- Porcentaje de germinación o viabilidad: mayor o igual al 90%
- Pureza: 100%
- Recuento directo de conidias: Pesar 1 g, de arroz esporulado, y agregar 10 ml de Tween 0,1%, en este caso la suspensión de conidias corresponde a 10-0, mezclar homogéneamente.

Luego se realiza la dilución 10-1 tomando 1 ml de la bolsita a un frasquito con 9 ml de Tween 0.1%, agitar durante 30 segundos en el vòrtex; y así hasta llegar a la dilución 10-2.

Con una pipeta Pasteur, tomar una muestra de la última dilución y llena la cámara de Neubauer. Llevar al microscopio y proceder a contar las conidias en el cuadrante central de la cámara. Contar cinco cámaras y determinar la concentración de conidias por ml mediante la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ conidias/ml} = X \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot ID$$

X = Promedio de conidias contadas ID = Inversa de la dilución empleada

Para obtener el número de conidias por gramo del producto, se multiplica el promedio del número de conidias por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión 10-0 y se divide por el peso de la muestra utilizada. Por ejemplo: Si el producto *B.bassiana* tiene una concentración de con/ g de 1010, está apto para ser utilizado en campo. (Villamizar R & Cotes, 2003)

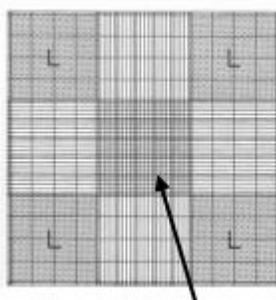
### 8. Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula, correspondiente a un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. (Zhang et al., 2018)

Así el área sombreada marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjeto éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjeto es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro que es igual a 0,0001 cm<sup>3</sup>

El conteo de conidias se realiza en el cuadrante medio central, contando cinco cuadraditos, los 4 de las esquinas y el centro

En cada cuadradito del cuadrante medio central se cuentan todas las conidias que se encuentran dentro y además las conidias que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda del cuadradito, no se cuentan las conidias que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha. (Ghayedi & Abdollahi, 2013)



Fuente: (Madriz, 2004) 1. Cámara de Neubauer

### 9. BIBLIOGRAFÍA

Albert, N., Nwaga, D., Nebane, C. L. N., Ntonifor, N., Tamo, M., & Parh, I. A. (2007). Arbuscular-

Mycorrhizal Fungi, Rhizobia and *Metarhizium anisopliae* Enhance P, N, Mg, K and Ca

Accumulations in Fields Grown Cowpea. *Journal of Plant Sciences*, 2, 518-529.

<https://doi.org/10.3923/jps.2007.518.529>

- Alejandro Rodríguez. (1999). *USO BIOLÓGICO DEL Metarhizium anisopliae (METCH.) Sorok. COMO ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DEL SALIVAZO (HOM :Cercopidae) EN LA CAÑA DE AZÚCAR.*  
 Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar. <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/cUhNdxGugcNbOZJtclYFEUXGHEVpjhAy>
- Alvarez, C., Giraldo, C., Marin, M. A., & Clavijo Giraldo, A. (2015). *Aportes para el monitoreo de mariposas en pasturas tropicales.*
- Anbesse, S. A., Adge, B. J., & Gebru, W. M. (2008). Laboratory screening for virulent entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema yirgalemense*) and fungi (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*) and assessment of possible synergistic effects of combined use against grubs of the barley chafer *Coptognathus curtipennis*. *Nematology*, 10(5), 701-709. <https://doi.org/10.1163/156854108785787217>
- Asi, M. R., Bashir, M. H., Afzal, M., Ashfaq, M., & Sahi, S. T. (2010). *COMPATIBILITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI, METARHIZIUM ANISOPLIAE AND PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS WITH SELECTIVE INSECTICIDES.* 8.
- Barajas, C. G., del Pozo, E. M., García, I., & Méndez, A. (2010). OBTENCIÓN DE CONIDIOS DEL AISLAMIENTO MA-002 DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN MEDIANTE UNA ALTERNATIVA DE CULTIVO BIFÁSICO. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 174-180.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1010-27522010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=pt)
- Bautista-Galvez, A., Barrera, J. F., Payró de la Cruz, E., Salgado-García, S., Gómez-Ruiz, J., & Gomez-Leyva, J. F. (2012). Genetic characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera:

Cercopidae). *Universidad y Ciencia*, 28(3), 217-229.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0186-29792012000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0186-29792012000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en)

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. <https://doi.org/10.3852/07-202>

Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., Moral, R. de A., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, I. (2016). Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.09.031>

CHANDLER, D. (1997). Selection of an Isolate of the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Virulent to the Lettuce Root Aphid, *Pemphigus bursarius*. *Biocontrol Science and Technology*, 7(1), 95-104. <https://doi.org/10.1080/09583159731081>

Doberski, J. W., & Tribe, H. T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(1), 95-100. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80013-1)

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

Francis, J. R. (2019). Biocontrol potential and genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* lineage in agricultural habitats. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 556-564. <https://doi.org/10.1111/jam.14328>

- Freed, S., Jin, F.-L., & Ren, S.-X. (2011). Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* from different geographical origins. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 359-370. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0466-8>
- García, G. (2004). *HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO UNA ALTERNATIVA EN EL CONTROL BIOLÓGICO*. 10.
- García, J., Elena, Posadas, J., Peticari, A., Alejandro, L., & Roberto, E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Promotes Growth and Has Endophytic Activity in Tomato Plants. *Advances in Biological Research*, 5, 22-27.
- Ghayedi, S., & Abdollahi, M. (2013). Biocontrol Potential of *Metarhizium Anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), Isolated from Suppressive Soils of the Boyer-Ahmad Region, Iran, Against J2s of *Heterodera Avenae*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(2). <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-f28373c7-154a-4707-8521-4f1dad249bc3>
- Hernandez, G., Hernandez, F., Sanchez-Arroyo, H., & Alatorre, R. (2007). Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Entomotropica*, 22, 27-36.
- Hernández-Rosas, F., García-Pacheco, L. A., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa-Sandoval, B., Salinas Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D. M., Díaz-Sánchez, E. L., Hernández-Rosas, F., García-Pacheco, L. A., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa-Sandoval, B., Salinas Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D. M., & Díaz-Sánchez, E. L. (2019). Analysis of research on *Metarhizium anisopliae* in the last 40 years.

*Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(SPE22), 155-166.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>

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

Jaramillo, J. L., Montoya, E. C., Benavides, P., & Góngora B., C. E. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de brocadel café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología*, 41(1), 95-104.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-04882015000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-04882015000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

Kabaluk, J. T., & Ericsson, J. D. (2007). *Metarhizium anisopliae* Seed Treatment Increases Yield of Field Corn When Applied for Wireworm Control. *Agronomy Journal*, 99(5), 1377-1381.

<https://doi.org/10.2134/agronj2007.0017N>

Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). Biological Control of Locusts and Grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 667-702.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>

Madriz, L. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*.

[https://www.academia.edu/24117171/MANUAL\\_DE\\_LABORATORIO\\_PARA\\_EL\\_MANEJO\\_DE\\_HONGOS\\_ENTOMOPAT%C3%93GENOS?from=cover\\_page](https://www.academia.edu/24117171/MANUAL_DE_LABORATORIO_PARA_EL_MANEJO_DE_HONGOS_ENTOMOPAT%C3%93GENOS?from=cover_page)

Maniania, N. K. (2002). A Low-cost Contamination Device for Infecting Adult Tsetse Flies, *Glossina* spp., with the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* in the Field. *Biocontrol Science and Technology*, 12(1), 59-66. <https://doi.org/10.1080/09583150120110662>

- Mnyone, L. L., Russell, T. L., Lyimo, I. N., Lwetoijera, D. W., Kirby, M. J., & Luz, C. (2009). First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. And *An. Arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasites & Vectors*, 2(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-59>
- Oulevey, C., Widmer, F., Kölliker, R., & Enkerli, J. (2009). An optimized microsatellite marker set for detection of *Metarhizium anisopliae* genotype diversity on field and regional scales. *Mycological Research*, 113(9), 1016-1024. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.005>
- Pattemore, J. A., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash, G. J. (2014). The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, 15(1), 660. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-660>
- Pilz, C. (2008). *Biological control of the Western Corn Rootworm Diabrotica virgifera by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae.*
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. Sp. Phaseoli. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288-293. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.823114>
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (2012). *Methods in Soil Biology.* Springer Science & Business Media.
- Silva, A. I. E., Morales, C. A. M., & Torres, M. M. (2011). Patogenicidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* (Metschn.), *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & Gams y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Sobre Thrips palmi Karny en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad*, 15(3), 147-151. <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/75>

- Tiago, P. V., Oliveira, N. T. de, & Lima, E. Á. de L. A. (2014). Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: Morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciência Rural*, 44, 645-651.  
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000400012>
- Villamizar R, L. F., & Cotes, A. M. (2003). Effect of the culture conditions over parameters of the action mode of *Metarhizium anisopliae*. *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), 121-126.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0120-04882003000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-04882003000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Zhang, X. C., Li, X. X., Gong, Y. W., Li, Y. R., Zhang, K. L., Huang, Y. H., & Zhang, F. (2018). Isolation, Identification, and Virulence of a New *Metarhizium anisopliae* Strain on the German Cockroach. *Journal of Economic Entomology*, 111(6), 2611-2616. <https://doi.org/10.1093/jee/toy280>

## **ANEXO**

### **MEDIOS DE CULTIVO**

#### **Agar - Agua (AA)**

Agar - 20 g

Agua destilada - 1,000 ml

Disolver el agar en el agua destilada

Calentar en baño maría o microonda y distribuir en erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml.

Tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.

Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

Se utiliza para aislamientos monospóricos y para porcentajes de germinación.

#### **Papa - Dextrosa - Agar (PDA)**

Papa: 250 g

Dextrosa o Glucosa: 18 g

Agar: 20 g

Agua destilada: 1000 ml

Preparación:

Lavar la papa, pelarla, pesarla, picarla en trozos pequeños

Ponerla a hervir en 1000 ml de agua destilada, por más o menos 35 minutos.

Filtrar a través de una gasa

Completar a un litro y agregar el agar y la dextrosa, mezclar bien.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco.

Taponar con algodón y papel platina

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

### **Papa – Dextrosa - Agar Levadura de Cerveza (PDA-LC)**

Puré de papa en hojuela: 5 g

Glucosa o Dextrosa: 18 g

Agar: 20 g

Agua destilada: 1000 ml

Preparación:

Poner a calentar el puré hasta que rompa en hervor y colar con paño suave, mezclar con el resto de ingredientes uniformemente.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 200 ml por frasco.

Taponar con algodón y papel platina

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión

### **Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)**

SDA: 65 g

Agar: 5 g

Agua destilada: 1000 ml

Preparación:

Agregar el SDA y el agar en el agua destilada.

Calentar la mezcla en baño maría hasta disolver.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco.

Taponar con una torunda de algodón y papel aluminio y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

El SDA es un medio de cultivo que se vende preparado y es utilizado para el aislamiento de diferentes hongos.

### **Solución antibiótica**

Pesar 0.05 gramos de Cloranfenicol en polvo dentro de un frasco estéril

Añadir 10 ml de 90 – 95% de alcohol (etanol). No esterilizar esta solución.

Añadir la solución antibiótica al agar esterilizado en una proporción de 10 ml por medio litro de medio.

Gentilmente invierta el frasco varias veces para distribuir la solución a través de todo el medio, pero no agite el frasco ya que se puede crear burbujas de aire.

Autoclavar el medio de nuevo por 10 minutos a 10 lbs y 115°C, para asegurar la esterilidad total.

Usar guantes todo el tiempo cuando manipule antibióticos concentrados. El Cloranfenicol es venenoso

### **Papa Dextrosa Levadura de cerveza (PDL)**

Papa 250 g

Levadura de cerveza 8 g

Dextrosa 18 g

Agua destilada 1000 ml

Preparar como el medio PD agregando la levadura de cerveza.

Preparación:

Poner a calentar las hojuelas en 500 ml de agua hasta que rompa en hervor y colar con paño suave, mezclar con el resto de ingredientes uniformemente.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml de capacidad a razón de 700 ml por frasco.

Taponar con algodón y papel platina

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

### **MEDIOS DE MONTAJE**

#### **Azul de lactofenol**

Fenol en cristales: 20 g

Ácido láctico: 20 ml

Glicerol: 40 ml

Agua destilada: 20 ml

Azul de algodón: 0,03 g

Preparación

Disolver el fenol en agua destilada tibia

Agregar el ácido láctico y la glicerina, mezclar bien.

Agregar el azul de algodón.

### **Solución de Tween al 0,1%**

Para el control de calidad de la producción se utiliza una solución conteniendo Tween al 0,1%. Esta solución tiene la propiedad de soltar las conidias, haciendo más fácil su dispersión para todos los procesos del control de calidad y bioensayos.

Se prepara de la siguiente manera:

Tween 20: 1 ml Agua destilada: 1000 ml

Mezclar el agua con el Tween, mover bien hasta homogenizar.

Verter en frascos de vidrio (250 ml) resistentes al calor, a razón de 100 ml por frasco. Tapar con papel platina

Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos. Esta solución puede prepararse y guardarse en refrigeración hasta ser utilizada

### **CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SILICA GEL**

Esterilización del sílica gel

Poner 3 g de sílica gel color amarillo en frasquitos de vidrio de 10 ml

En la boca del frasco colocar un cono hecho de cartulina y taparlo con papel aluminio.

Esterilizar en el horno durante 1 hora a 180 °C.

Suspensión e inoculación del hongo

En la placa esporulada del hongo, verter 10 ml de leche estéril al 20%.

Con la ayuda de una espátula raspar la superficie de la placa y homogenizar

Con una pipeta verter la suspensión en una placa de Petri estéril, y con la ayuda de la pinza estéril sumergir pedacitos de papel bond estéril (aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>).

Extraer con la pinza los pedacitos de papel bond humedecidos en la suspensión con el hongo y colocarlos en una placa de Petri estéril para que sequen a temperatura ambiente, durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo se colocarán aproximadamente 20 pedacitos de papel inoculados con el hongo, en cada uno de los conos de cada frasco, enseguida se reemplazará la tapa de papel aluminio por la tapa de rosca estéril.

## Manual de Producción de *Metarhizium anisopliae*

### Metarhizium anisopliae

*M. anisopliae* es un hongo entomopatógeno presente en los suelos y consta de numerosos genotipos con una distribución mundial, desde el Ártico hasta los trópicos. Numerosos factores bióticos y abióticos influyen en la capacidad de los hongos entomopatógenos para infectar a sus huéspedes y persistir en el medio ambiente. (Butt et al., 1994)

El suelo parece ser un medio favorable para la aplicación del inóculo fúngico, sin embargo, es un medio muy complejo, que varía en su composición mineral, textura y estructura y muestra un entorno extremadamente competitivo (Keller et al., 2003).

La mayoría de los insectos hospedadores de *M. anisopliae* pertenecen al orden Coleópteros y especialmente a los insectos que viven en el suelo. Algunas cepas y genotipos son más restringidos (Ferron, 1978). Jaronski & Jackson, (2008) informaron de que los aislados son aún más específicos en condiciones de campo en comparación con los estudios de laboratorio

Durante los últimos años, los aislados de *M. anisopliae* han sido caracterizados por varias técnicas moleculares, además de por técnicas morfológicas, ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron para estudiar la diversidad genética y de los aislados de *M. anisopliae*. (Dimbi et al., 2003) *M. anisopliae* se considera seguro, con riesgos mínimos para los vertebrados, los seres humanos y el medio ambiente.

### *Metarhizium anisopliae*

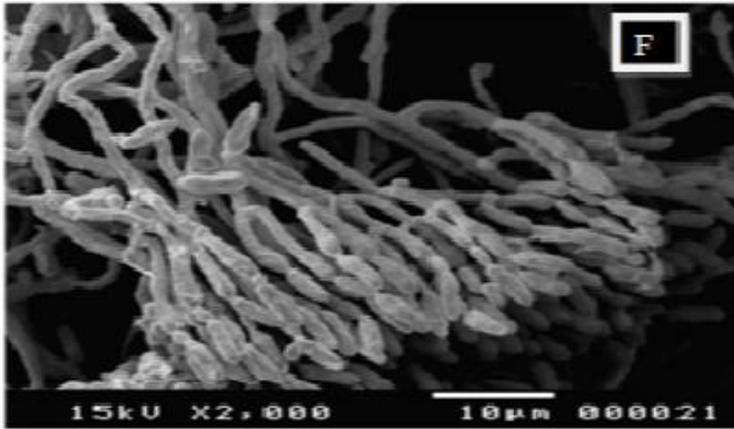
El hongo *Metarhizium anisopliae*, es un biocontrolador, con mayor potencial entomopatógeno en el control de insectos plaga, pertenece al reino Fungi, clase Hyphomycetes. Este hongo se adhiere a la cutícula de los insectos y entra al interior del mismo por las partes blandas o por vía oral. Al encontrarse en el interior del insecto, ocurre la germinación de las esporas y el micelio produce la toxina que ocasiona la muerte al huésped en un intervalo de 3 a 4 días. (Quesada-Béjar, 2020)



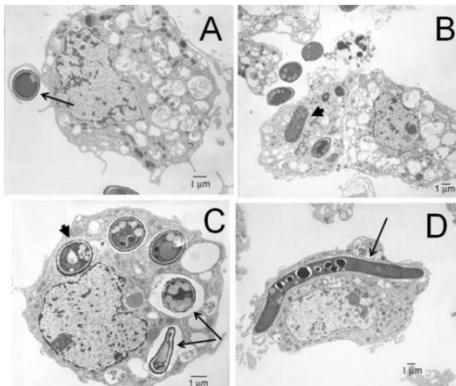
Aislados de *M. anisopliae* en caja petri a partir de captura de insectos.

Caracteres morfológicos de *M. anisopliae* aislados del suelo

- Largo:  $7,52 \pm 0,79 \mu\text{m}$
- Ancho:  $2,9 \pm 0,54 \mu\text{m}$
- Relación (L/A):  $2,59 \mu\text{m}$



Fotografía de microscopio electrónico de barrido de *M. anisopliae*,



Imágenes TEM (microscopía electrónica de transmisión) de la internalización de conidios de *M. anisopliae* en garrapatas. (A) 10 minutos de infección. (B) 30 minutos; una célula fúngica sin membrana circundante clara. (C) 2 h; las flechas grandes indican células fúngicas en grandes vacuolas. (D) 16 h; corte transversal de un conidio germinado dentro de una célula de garrapata.

#### Materiales:

- Agua destilada
- Cajas Petri
- Agar
- Mandil
- Alcohol
- Agar 15g
- Dextrosa 20g
- Cajas Petri o frascos esterilizados (mermelada, café, etc).
- Papel aluminio
- Medio SDA
- Ácido cítrico o jugo de limón
- Tubos de ensayo
- Colador

- Muestras de suelo
- Fundas ziploc



## CAPTURA

### Método de Captura (cebo)

En un vial que contenga aproximadamente 60 g de muestra de suelo, añada 4 larvas de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) y mantenga los viales a  $25 \pm 2$  °C durante un período de 14 días.

Con el cebo (insecto micotizado):

1. Se sumerge a los insectos de 10 segundos a 3 minutos en hipoclorito de sodio al 0.05 se enjuaga tres veces en agua destilada estéril y se ponen sobre un papel toalla para eliminar el exceso de agua.
2. Los insectos desinfectados se ponen en una cámara húmeda, que consiste en una placa de Petri estéril, en donde se coloca al insecto y a un costado se pone un algodón embebido en agua estéril, se sella con cinta parafilm e incuban durante 5 a 10 días.

## ASLAMIENTO

1. Las cámaras húmedas preparadas, se revisan a partir del quinto día observando al estereoscopio los insectos esporulados, con la ayuda de un asa de siembra se toma una muestra del hongo y se coloca sobre una lámina porta objeto con una gota de azul de lacto fenol, se extiende la muestra y se coloca un cubre objeto, observando el preparado al microscopio, una vez confirmada la especie que se desea aislar, se procede a sembrar el hongo por puntura en placas de Petri con medio de cultivo SDA acidificado o con antibiótico, a partir del mejor insecto esporulado.
2. Incubar las placas preparadas durante 5 a 10 días a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. (Alvarez et al., 2015)
3. Sembramos en cajas Petri con agar (50g/l) y se incuban durante 24 a 30 horas a una temperatura de 25°C, lo que permite el crecimiento de las colonias aisladas.

## PROPAGACIÓN

1. Preparación del medio líquido: En frascos erlenmeyer o matraces a razón de 700 ml por frasco de 1000 ml, se cubren con papel aluminio y se esteriliza a 121 °C y 15 lbs (1 atm) de presión por 20 minutos.(Sasan & Bidochka, 2013))
2. Inoculación e incubación del medio líquido. (Frascos Erlenmeyer) Una vez fríos los medios líquidos, se llevan a la cámara de flujo laminar y se le agrega aproximadamente 0.1 g de cloranfenicol a granel. Se selecciona la mejor placa previamente analizada, es decir libre de contaminación, buena esporulación y morfología microscópica típica. Se agrega 10 ml de agua

destilada estéril más Tween y con la ayuda de una espátula o una cucharilla flameada y enfriada con alcohol, se raspa suavemente la superficie de la placa, para soltar las esporas o conidias, se agrega 10 ml de agua destilada estéril más Tween, con una pipeta estéril se toma 5 ml de la solución y se agrega al medio líquido frío. (Silva et al., 2011)

3. Preparación del sustrato: En bolsas de polipropileno agregar por cada 800 g de arroz y 200 ml de agua llevar a la autoclave a 121 °C, 15 Lb de presión (1 Atmosfera), por 30 minutos, El tiempo de esterilización está en relación conforme aumente la cantidad de bolsas. (Ferron, 1978)



4. Inoculación del sustrato con el medio líquido de frascos erlenmeyer: una vez frías, las bolsas con el arroz se llevan a la cámara de flujo laminar, se desinfecta el borde de cada bolsa con un algodón embebido en alcohol, se abre cuidadosamente la bolsa y se inocula con 30 ml del caldo líquido agitado. Con un frasco de medio preparado se inoculan 20 bolsas. Se cierra nuevamente la bolsa y se agita para homogenizar el inóculo con el sustrato. Temperatura recomendada de 25 a 28°C (Lomer et al., 2001)

## ANEXOS

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

SDA: 65 g

Agar: 5 g

Agua destilada: 1000 ml

Preparación:

Agregar el SDA y el agar en el agua destilada.

Calentar la mezcla en baño maría hasta disolver.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco.

Taponar con una torunda de algodón y papel aluminio y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

El SDA es un medio de cultivo que se vende preparado y es utilizado para el aislamiento de diferentes hongos.

Solución antibiótica

Pesar 0.05 gramos de Cloranfenicol en polvo dentro de un frasco estéril

Añadir 10 ml de 90 – 95% de alcohol (etanol). No esterilizar esta solución.

Añadir la solución antibiótica al agar esterilizado en una proporción de 10 ml por medio litro de medio.

Gentilmente invierta el frasco varias veces para distribuir la solución a través de todo el medio, pero no agite el frasco ya que se puede crear burbujas de aire.

Autoclavar el medio de nuevo por 10 minutos a 10 lbs y 115°C, para asegurar la esterilidad total.

Usar guantes todo el tiempo cuando manipule antibióticos concentrados. El Cloranfenicol es venenoso  
Papa Dextrosa Levadura de cerveza (PDL)

Papa 250 g  
Levadura de cerveza 8 g  
Dextrosa 18 g  
Agua destilada 1000 ml

Preparar como el medio PD agregando la levadura de cerveza.

Preparación:

Poner a calentar las hojuelas en 500 ml de agua hasta que rompa en hervor y colar con paño suave, mezclar con el resto de ingredientes uniformemente.

Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml de capacidad a razón de 700 ml por frasco.

Taponar con algodón y papel platina

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

Solución de Tween al 0,1%

Para el control de calidad de la producción se utiliza una solución conteniendo Tween al 0,1%. Esta solución tiene la propiedad de soltar las conidias, haciendo más fácil su dispersión para todos los procesos del control de calidad y bioensayos.

Se prepara de la siguiente manera:

Tween 20: 1 ml Agua destilada: 1000 ml

Mezclar el agua con el Tween, mover bien hasta homogenizar.

Verter en frascos de vidrio (250 ml) resistentes al calor, a razón de 100 ml por frasco. Tapar con papel platina

Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos. Esta solución puede prepararse y guardarse en refrigeración hasta ser utilizada