



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

"IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
METARHIZIUM SSP DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA
PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA"

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

Autor:
Aymacaña Chulca Stalin Jahir

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

LATACUNGA - ECUADOR

Febrero 2025

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 AYMACAÑA CHULCA STALIN JAHIR, identificado con cédula de ciudadanía 172750549-5 de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará EL CEDENTE; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto

representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en ta Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará LA CESIONARIA en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE es una persona natural estudiante de la carrera de Agronomías titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE METÁRHIZIUM SSP DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA", la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicia de la carrera: Abril 2021 - Agosto 2021

Finalización de la carrera: Octubre 2024 — Marzo 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 12 de diciembre del 2024.

Tutor: Inge Chancusig Espín Edwin Marcelo, Ph.D.

Tema: "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE METARHIZIUM SSP DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA"

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

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

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

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular dei derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

ii

- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

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

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

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

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

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

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

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

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 21 días del mes de febrero del 2025.

Stalin Jahtr ymacaña Chulca
EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
LA CESIONARIA

lii

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

"IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE METARHIZIUM SSP DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA" de Aymacaña Chulca Stalin Jahir, de la carrera de Agronomía, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la predefensa.

Latacunga, 21 de febrero del 2025

Ing. Chac SI In Edwin Marcelo, Ph.D.
c.c: 05 114883-7
DOCENTE TUTOR


iv

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Aymacaña Chulca Stalin Jahir, con el título de Proyecto de Investigación: "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE METARHIZIUM ssp DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA", ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

Latacunga, 21 de febrero del 2025



Ing. Carlos Javier Torres Miño, Ph.D. Ing. Clever Guerra, MSc.
C.C: 0502329

0501715494

LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Clever Guerra, MSc.
0502329238 c.c:

LECTOR 2 (MIEMBRO)

Ing. Di a Elizabeth Toapanta Gallegos, Mg.

CC: 1002749800

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios y a la Virgencia del Quinche por darme la salud, por guiarme en mi camino ante todo por mi meta y logro que he soñado tener durante toda mi vida, a mis padres Luis Aymacaña y Mercedes Chulca por brindarme todo su apoyo incondicional durante mi formación personal y profesional por todos sus consejos motivadores que me han dado durante toda la vida para no desmayar y cumplir mi sueño.

También quiero expresar mi fraterno agradecimiento al Mg. Edwin Marcelo Chancusig, PhD. por su paciencia y colaboración, también como no agradecer a la Ing. Tania Llanos por su apoyo incondicional, la confianza que me dio y sus palabras motivadoras

que han hecho hincapié para no desmayar y llegar a cumplir mis metas propuestas.

Stalin Jahir Aymacña Chulca

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación primeramente se lo dedico a Dios y a la Virgencita del Quinche por haberme echo cumplir mi sueño, a mis padres queridos Luis Aymacña y Mercedes Chulca por ser mi apoyo incondicional, por su amor que me brindaron durante mi formación profesional por su apoyo insignificante y por sus palabras de motivación las cuales me dieron fuerza de seguir adelan[e,

Á mis hermanos À/fatias Aymacña y David Áymacña por nunca dejarme solo y darme su apoyo para poder seguir adelante.

A mi novia Aracelly Gómez, por su apoyo incondicional, por apoyarme en todo el transcurso del proceso de litulación, por darme Jzurza con su amor, paciencia y cariño que me tiene gracias a ella por estar a mi lado y no haberme dejado solo.

Stalin Jahir Aymacña Chulca

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE METARHIZIUM *ssp* DEL BARRIO LLANO LARGO DE LA PARROQUIA EL CHAUPI DEL CANTÓN MEJÍA"

Autor:

Aymacaña Chulca Stalin Jahh•

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Cotopaxi tuvo como objetivo identificar y caracterizar la cepa de *Metarhizium ssp*, la cual se identificó en muestras de suelo del barrio Llano Largo de la parroquia El Chaupi del Cantón Mejía. Para la reactivación de la cepa se utilizaron técnicas de multiplicación como bisturí y asas de siembra, se determinó que el bisturí resultó ser lo más eficiente para obtener el aislamiento de *Metarhizium ssp*, ya que se mostró mayor esterilidad y lograron inhibir la contaminación de las cajas Petri. Además, se identificó las características macroscópicas de *Metarhizium ssp* y se logró reconocer diversas estructuras morfológicas como: hifas, conidióforos y conidios. También, se realizó la extracción de ADN del hongo, lo cual conllevó a optimizar el protocolo y adecuarlo a las condiciones del laboratorio.

Asimismo, se estandarizó el protocolo para la ampliación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la región Internal Transcribed Spacer (ITS) del genoma del hongo y se verificó el tamaño del fragmento en electroforesis horizontal. La muestra amplificada fueron secuenciadas utilizando la secuenciación Sanger a través del laboratorio IDGEN ubicado en Quito. Se realizó el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas utilizando el software Geneious Prime v2025 y se comparó la secuencia consenso frente a las reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) a través del pipeline de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Los resultados obtenidos indicaron que las muestras contenían una sola especie, la cual fue identificada como *Metarhizium anisopliae*. Esta investigación contribuirá significativamente a la comprensión de *Metarhizium anisopliae*, lo que tiene importantes implicaciones para su aplicación efectiva en el control biológico de plagas agrícolas, promoviendo así prácticas sostenibles y amigables con el medio ambiente en el manejo de cultivos y ecosistema.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, morfológicas, control biológico, ADN, Reactivación.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

TOPIC: "MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF METARHIZIUM SSS FROM LLANO LARGO NEIGHBORHOOD IN EL CHAUPI AT MEJIA CITY"

Author: Aymacaña Chulca
Stalin Jahir

ABSTRACT

This research was carried out in the Microbiology laboratory in Cotopaxi Technical University, its aim was to identify and characterize the strain of *Metarhizium ssp*, which was identified in soil samples from the Llano Largo neighborhood in El Chaupi at Mejía city. To reactivate the strain, multiplication techniques such as: scalpel and inoculation loops were used, so the scalpel was the most productive to get the isolation of *Metarhizium ssp*, due to the fact it showed greater sterility and reach to inhibit from Petri boxes contamination. In addition, the macroscopic characteristics of *Metarhizium ssp* were identified and various morphological structures were recognized such as: hyphae, conidiophores and conidia. Also, the DNA extraction from fungus was carried out, *Which allow to optimize the protocol and adapting it to the laboratory conditions.

Additionally, the protocol of the amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region from fungal genome was standardized and the fragment size was verified in horizontal electrophoresis. The amplified sample was sequenced using Sanger sequencing through the IDGEN laboratory that was located in Quito. The bioinformatics analysis of the sequences was performed using the Geneious Prime v2025.0 software, and the consensus sequence was compared against, those ones which were reported by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) through the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) pipeline. The results that were gotten, indicated that the samples contained single species, which was named as *Metarhizium anisopliae*. This research will contribute to understand the *Metarhizium anisopliae* significantly, which has important involvement in its effective application in the biological control of agricultural pests, promoting sustainable and environmentally friendly practices in crop and ecosystem management.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, morphological, biological control, DNA, Reactivation.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--------------------------------------|---|
| INFORMACIÓN GENERAL..... | 1 |
| 2, JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO..... | 2 |
| 3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO..... | 3 |
| 3.1 Beneficiarios directos | 3 |
| 3.2 Beneficiarios indirectos , | 3 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 3 |
| 5. OBJETIVOS..... | 4 |
| 5.1, General..... | 4 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2. Específicos..... | 4 |
| 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS..... | 5 |
| 7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA..... | 6 |
| 7.1 Aislamiento de <i>Metarhizium</i> | 6 |
| 7.2 <i>Metarhizium</i> | 6 |
| 7.3 Clasificación taxonómica <i>Metarhizium</i> | 7 |
| 7.4 Hábitat del hongo <i>Metarhizium</i> | 7 |
| 7.5 Plagas que ataca el hongo <i>Metarhizium</i> | 8 |
| 7.6 Características del hongo <i>Metarhizium</i> | 8 |
| 7.7 Temperatura y humedad de crecimiento de <i>Metarhizium</i> | |
| 7.8 Mecanismo de acción del <i>Metarhizium</i> | 9 |
| 7.9 Microorganismos benéficos..... | 10 |
| 7.10 Utilización de los microorganismos benéficos en el suelo..... | 10 |
| 7.11 Que es una identificación molecular..... | 11 |
| 7.12 Como se identifican los hongos..... | 11 |
| 7.13 Cuales son los métodos de identificación molecular..... | 12 |
| 7.14 Que son ITS..... | 13 |
| 7.15 Para qué sirven los ITS en la identificación del hongo *..... | 13 |
| 8. VALIDACIÓN DE LA PREGUNTA..... | 13 |
| 8.1 Pregunta Científica..... | 13 |
| 9. METODOLOGÍA..... | 13 |
| 9.1. Tipo de investigación..... | 13 |
| 9.1.1 Investigación bibliográfica documental..... | 13 |
| 9.2 Métodos de investigación..... | 14 |
| 9.2.1 Cualitativo..... | 14 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 9.3 Ubicación de la investigación..... | 14 |
| 9.4 Recolección de muestras..... | 14 |
| 9.5 Materiales y reactivos..... | 16 |
| 9.5.1 Materiales..... | 16 |
| 9.5.2 Reactivos..... | 16 |
| 9.6 Aislamiento del hongo a partir de muestras de suelo..... | 18 |
| 9.7 Métodos de multiplicación | 18 |
| 9.8 Extracción de ADN..... | 20 |
| 9.8.1 Protocolo de extracción de ADN..... | 20 |
| 9.9 Reacción en cadena de la polimerasa PCR . . . , , | 20 |
| 9.10 Análisis Bioinformático..... | 21 |
| I O. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 22 |
| 10.1 Observación macroscópica de Metarhizium. | 22 |
| 10.2 Observación microscópica de Metarhi.zium..... | 23 |
| 10.3 Identificación morfológica de Metarhizium | 24 |
| 10.4 Identificación molecular....., , , , | 25 |
| xi | |
| 10.4. 1. Extracción y Cuantificación de ADN..... | 25 |
| 10,4.2 Amplificación de la región ITS por PCR | 26 |
| 10.4.3 Análisis bioinformático | 27 |
| 1 1. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)..... | 2 |
| 1.1 Impacto social....., | 28 |
| 1.1.1 Impacto económico | 28 |
| 1.1.3 Impacto ambiental..... | 29 |
| 12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO..... | 29 |
| 13, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 31 |

| | |
|---------------------------|----|
| 13. I Conclusiones..... | 31 |
| 13.2 Recomendaciones..... | 32 |
| 14. BIBLIOGRAFÍA..... | 32 |
| 15. ANEXOS ...t..... | 1 |

DE
ÍNDICE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tabla I Clasificación taxonómica del <i>Metarhizium</i> | 7 |
| Tabla 2 Equipos de laboratorio utilizados para elaborar la investigación. | .. . 17 |
| Tabla 3 Características morfológicas de <i>Metarhizium</i> vistas a través del microscopio..... | 24 |
| Tabla 4 Costos del proyecto de investigación | _____ . 29 |

íNDICE FIGURAS

Figura I Ubicación del laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Figura 2 Ubicación de la recolección de muestras,..... 15

Figura 3 Crecimiento radial de (*Metarhizium*), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo. 22

Figura 4 Visualización de *Metarhizium* en el microscopio. 23

Figura 5 Resultados de cuantificación de ADN a través del equipo NanoDrop One^c 26

Figura 6 Electroforesis de fragmentos ITS amplificados por PCR. M: Marcador de peso molecular de 100bp, G): Control negativo, M8: *Metarhizium*, (+): Control positivo. 27

Figura 7 Análisis de las secuencias ITS de la muestra M8 en el software Geneious prime v2025.0 27

Figura 8 Resultado del alineamiento de la secuencia consenso versus las secuencias del NCBI_ utilizando la herramienta BLAST 28

DE

xiv

ÍNDICE ANEXOS

| | | |
|---------|-------------------------------------------------------------|--------|
| Anexo I | Resultado del análisis molecular | 1 |
| Anexo 2 | Observación de la cepa nativa de Metarhizium conservada | 1 |
| Anexo 3 | Materiales y equipos para la reactivación de Metarhizium. | 2 |
| Anexo 4 | Toma de fotos del proceso de reactivación de Metarhizium. | 7 |
| Anexo 5 | Primeros resultados al reactivar Metarhizium. | 9 |
| Anexo 6 | Segundo intento de reactivación utilizando antibiótico | 9 |
| Anexo 7 | Lente usado para identificar es 20x10.40Phl | 10 |
| Anexo 8 | Toma de fotos del proceso de identificación en Metarhizium. | t..... |
| . * I | | |

INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

"Identificación morfológica y molecular de *Metarhizium* ssp del barrio Llano Largo de la parroquia el Chaupi del Cantón Mejía".

Fecha de inicio:

Octubre 2024

Fecha de finalización:

Marzo 2025

Lugar de ejecución:

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

Facultad que auspicia Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia: Carrera de Agronomía

Equipo de Trabajo:

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

e Investigador 1: Aymacaña Chulca Stalin Jahil'

Coordinador del Proyecto:

Aymacaña Chulca Stalin Jahir

Teléfonos: 0990387032

Correo electrónico: stalin.aymacana5495@utc.edu.ec

Area de Conocimiento:

Agricultur' & Agricultura, silvicultura y pesca- Agronomía

Línea de investigación:

Desarrollo y Seguridad alimentaria

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Producción Agrícola Sostenible.

Línea de vinculación de la carrera:

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

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El hongo *Metarhizium* es uno de los principales entomopatógenos empleados como bioinsecticida. Este hongo tiene un amplio rango de insectos hospederos de diferentes órdenes, entre los que se incluyen plagas de lepidópteros de importancia agrícola. El ciclo biológico de este hongo comprende una fase infectiva celular en el interior del insecto y otra saprofita cuando el hongo completa su ciclo al aprovechar los nutrientes del cadáver del insecto. Los insectos muertos por este hongo son inicialmente cubiertos de forma total por micelio de color blanco, el cual se torna verde cuando el hongo esporula. (Faria y Wraight et al. 2007)

En cuanto a los mecanismos de acción del hongo presentan una ventaja sobre las bacterias y los virus debido a que éstos deben ser ingeridos por el insecto para actuar. En el caso del hongo pueden ingresar por contacto a través de un proceso de infección en la cutícula del insecto. (Jimenez, 2015, pág. 2)

Una de las alternativas es la cepa de *Metarhizium* que es un hongo entomopatógeno prometedor que podría ofrecer una solución efectiva para el manejo de plagas agrícolas sin los riesgos asociados con los pesticidas químicos. (Gurr, 2000)

Además, es importante recalcar que en vez de usar productos químicos se debe usar bioplaguicidas ya que son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente. Los pesticidas tradicionales, por el contrario, en general son materiales sintéticos, que no sólo afectan a la plaga objetivo sino también organismos no deseados, tales como insectos benéficos, la vegetación circundante y la vida silvestre. (EPA, 2010). Sin embargo, existen algunos inconvenientes en cuanto al uso de los químicos, por ejemplo, estos pueden ser dañinos para otros organismos que no son el objetivo, o si se trata de un organismo bioregulador,

este elimine a otro que es importante en la cadena trófica de un ecosistema, lo que repercutiría en la población de individuos que se alimentan del insecto plaga que se está tratando de regular,

(Perez, págs. 17-29)

La caracterización de la cepa local de *Metarhizium* permite aprovechar la biodiversidad regional para encontrar cepas que estén adaptadas las condiciones específicas del barrio Llano Largo. La Identificación de la cepa con características excepcionales contra patógenos locales puede mejorar la eficacia del biocontrol en el barrio y promover el uso de recursos naturales locales.

Por otro lado, la identificación y utilización de la cepa local no solo mejorara la protección de cultivos, sino que también puede fomentar el desarrollo económico local al promover la producción y comercialización de biocontroladores, esto puede generar empleo y oportunidades económicas del barrio.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1 Beneficiarios directos

Los beneficiarios directos del presente proyecto de investigación son los agricultores, productores, exportadores de la localidad debido a que se puede aplicar el hongo entomopatógeno como un agente biocontrolador.

Otros beneficiarios directos corresponden tanto a Eos docentes como a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Cotopaxi quienes identificarán la potencialidad que presenta el Ecuador para la producción de bioplaguicidas.

3.2 Beneficiarios indirectos

Los beneficiarios indirectos corresponden a los consumidores de productos vegetales, al barrio y parroquia quienes generalmente presentan inconvenientes de salud por consumir productos contaminados por una gran cantidad de químicos,

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el caso de *Metarhizium* aunque existen múltiples métodos para su reproducción los costos asociados a estas técnicas son considerablemente altos lo que dificulta su adopción masiva.

Superar estos obstáculos es esencial para potenciar el uso de estos agentes biológicos como herramientas sostenibles en el manejo de plagas agrícolas. (Dimbi, Maniania, & Lux, págs. 7-8)

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Metarhizium*, se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; para su producción masiva en condiciones in vitro tiene la capacidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo. (Ati, 2009, pág. 73)

En Brasil, *Metarhizium* es el hongo entomopatógeno que se produce y utilizan ampliamente para el control de salivazos (*Mahanarva andigena* Jacobi) en plantaciones de caña. de azúcar, con aplicaciones anuales en aproximadamente dos millones de hectáreas. (Rosas, 2019, págs. 155-166)

Los hongos entomopatógenos destacan por sus características únicas que los posicionan como biocontroladores altamente efectivos gracias a su elevado poder patogénico y su capacidad para producir epifitas. No obstante, su producción a escala comercial e industrial enfrenta diversos desafíos como la falta de conocimiento sobre sustratos alternativos eficientes la limitada disponibilidad de infraestructura adecuada y la ausencia de equipos básicos necesarios. Estas limitaciones han restringido su desarrollo y aplicación a gran escala.

(Rosas, 2019)

5. OBJETIVOS

5.1. General

Identificar morfológica y molecularmente la cepa *Metarhizium* del barrio Llano Largo de la Parroquia El Chaupi del Cantón Mejía.

5.2, Específicos e Identificar morfológicamente la cepa de *Metarhizium* colectada en la zona del barrio

Llano Largo parroquia El Chaupi.

- Caracterizar molecularmente la cepa de *Metarhizium* colectada en la zona del barrio

Llano Largo parroquia El Chaupiq

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

| Objetivos Específicos | Actividades | Responsable | Medio de verificación |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> Identificar morfológicamente la cepa de <i>Metarhizium</i> colectada en la zona del barrio Llano Largo parroquia El Chaupi. | <ul style="list-style-type: none"> Recolección de muestras de suelo de diferentes zonas agrícolas. Aislamiento de <i>Metarhizium</i> de la muestra de suelo en el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía. Purificación u obtención de cultivos puros. Identificación de colonias de <i>Metarhizium</i> de acuerdo a sus características morfológicas. | Stalin Aymacaña | Fotografías Cajas Petri con cultivos puros. |

muestra de suelo en el laboratorio de microbiología de la carrera de agronomía.

Purificación u obtención de cultivos puros.

Identificación de

| | | | |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <p>Caracterizar la de molecularmente cepa de Metarhizium,</p> | <p>racción de ADN la cepa de Metarhizium. Amplificación de regiones específicas de ADN mediante análisis filogenético de las secuencias obtenidas.</p> | <p>Station Aynacaña</p> | <p>Fotografías con Microtubos del muestra de Metarhizium.</p> |
| | <p>colonias de Metarhizium de acuerdo sus características del PCR.</p> | | |

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Aislamiento de Metarhizium

La obtención de cepas de Metarhizium, y otros hongos entomopatógenos, se puede hacer mediante recolecta y procesamiento de muestras de suelo, recolecta en campo de insectos infectados, e incluso de colecciones de hongos entomopatógenos. (Hernández J. A., 2020, pág. 88)

7.2 Metarhizium.

Es un género de hongo con especies capaces de generar enfermedad en insectos y matarlos. A la enfermedad causada por este hongo se conoce como la muscardina verde, Posee un muy amplio rango de hospedador, es seguro y amigable con el ambiente y fácil de producir

a escala comercial. (García-Pacheco, 2019, pág. 2)

Si bien a *Metarhizium* se le conoce generalmente por su capacidad entomopatógena, este hongo también es capaz de mantener relaciones simbióticas con plantas al asociarse a sus raíces. Estudios recientes han demostrado que *Metarhizium* es un organismo benéfico porque mejoran la estructura del suelo y el microbioma. También, son probióticos que desplazan microorganismos perjudiciales, se comportan como hongos parecidos a micorrizas que

mejoran la absorción de agua y nutrientes y disparan una resistencia sistémica inducida en la planta hospedadora. (García-Pacheco, 2019, pág. 2)

Además, es un hongo filamentoso caracterizado y utilizado para el control de plagas, además el uso de sus enzimas es empleado como catalizador biológico en el sector agrícola es una de las especies más comunes que se han encontrado, estudiado y utilizado en todo el mundo principalmente como biocontrolador. Este hongo se ha aplicado con éxito para controlar plagas en caña de azúcar y en plagas de diversos insectos. (García-Pacheco, 2019, pág. 2)

7.3 Clasificación taxonómica *Metarhizium*

El hongo *Metarhizium* es un tipo de hongo entomopatógeno incompleto que pertenece a la división *Ascomycota*, la clase *Sordariomycetes*, el orden *Hypocreales* y la familia *Clavicipitaceae*. Es un hongo cosmopolita y pertenece a la Clase *Sordariomycetes*, siendo capaz de reproducirse a través de la formación de conidias. (Pavone, Tecnovita, 2021, pág.

1)

Tabla 1 Clasificación taxonómica del *Metarhizium*.

| Taxonomía | |
|-----------|-------|
| Reino | Fungi |

| | |
|------------|------------------|
| Division | Áscomycot.a |
| Clase | Sordariomycetes |
| Orden | Hypocreales |
| Familia | Clavicipitaceae |
| Subfamilia | Tillandsioid.eae |
| Genero | Metarhizium |

Fuente: Recuperado de (Pavone, Tecnovita, 2021)

7.4 Hábitat del hongo Metarhizium

El hongo Metarhizium se considera comúnmente saprofitas del suelo y se encuentran con mayor frecuencia en hábitats perturbados, como los campos agrícolas, plantas e insectos en comparación con los ecosistemas forestales. (Ugine, 2019, pág. 1)

7.5 Plagas que ataca el hongo Metarhizium

Metarhizium tiene la capacidad de parasitar a más de 300 especies de insectos pertenecientes a diferentes órdenes. Los insectos que son afectados por este hongo muestran una cubierta completa de micelio sobre sus cuerpos después de la muerte. Inicialmente, el micelio es de color blanco, pero adquiere una tonalidad verde cuando el hongo comienza a esporular. (Hernández d. , 2019, pág. 3) o Mosca Blanca (Bemisia tabaci)

La mosca blanca es una especie polífaga, capaz de afectar a más de 200 especies herbáceas, aunque se encuentra principalmente en los invernaderos, donde afecta a tomate, pepino, melón, berenjena, judía, afecta más a las hojas y a los frutos. (Phytoma , 2020) e Gallina ciega (Phyllophaga vetula Horn)

Es una plaga que ocasiona daños considerables a diversos cultivos (maíz, sorgo, papa, trigo, tomate, arroz de temporal, frijol, frutales, agave, café) y en muchos casos pérdida total de reproducción. Las larvas bien desarrolladas destruyen todo el sistema de raíces de la planta en el transcurso de unos cuantos días, por lo que su control depende generalmente de productos químicos. Ante el problema del uso excesivo de productos químicos para el control de gallina ciega, resulta necesario llevar a cabo un manejo

integrado, donde se logre eliminar o mantener el daño causado por debajo del umbral económico. (Intagri, 2008)

e Psílido de la papa (*Bactericera cockerelli*)

Es una especie polivoltina, que tiene más de una generación por año, el principal daño directo se le conoce como amarillamiento del psílido, el cual da como resultado un crecimiento retardado, bajo vigor en las hojas nuevas, clorosis/emboscamiento o coloración púrpura en la parte basal de las hojas, entrenudos y frutos. (Koppert, 2020)

7.6 Características del hongo *Metarhizium*

Los conidios adoptan una forma ovalada o elipsoidal con extremos redondeados, generalmente miden entre 5 y 9 μm de longitud y de 2 a 3 μm de ancho, su color es un verde característico que varía de un verde brillante a un verde oscuro dependiendo de la especie.

(Guamantaqui, 2024, pág. 1)

Sus hifas son filamentos septados que conforman el micelio del hongo, estas estructuras permiten la colonización de los tejidos del insecto huésped tras la penetración inicial, el diámetro de las hifas oscila entre 2 y 4 μm (Guamantaqui, 2024)

Los conidióforos muestran una ramificación irregular, con aproximadamente 2-3 ramas por septo y tiene una longitud que oscila entre 4-14 μm , con un diámetro de μm .

(Guamantaqui, 2024, pág. 22)

Las fialides, por su parte, se presenta de forma redonda con un ensanchamiento en el ápice, midiendo entre 6-13 μm de longitud y 2-4 μm de diámetro. (Guamantaqui, 2024)

El crecimiento del micelio sobre el insecto infectado es inicialmente de color blanco tomándose verde cuando el hongo esporula. (Guamantaqui, 2024)

7.7 Temperatura y humedad de crecimiento de *Metarhizium*

En un ambiente controlado de laboratorio *Metarhizium* crece mejor en un rango de temperatura. de 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$, siendo 27 $^{\circ}\text{C}$ la más frecuente para su óptimo desarrollo y

esporulación, La humedad relativa para la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo debe ser superior al 90%. (Pedraza, 2015, pág. 17)

7.8 Mecanismo de acción del *Metarhizium*

El hongo entomopatógeno tiene un gran potencial como agente de control, ya que constituye un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provoca infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos. (Díaz, 2006, pág. 2)

Según (Díaz, 2006, pág. 2) este hongo inicia su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, comenzando el hongo a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas y lipasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo.

Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de

3 a 14 días de iniciada la infección. Una vez muerto el insecto y ya agotados muchos de los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelar e invade todos los órganos del hospedero.

(Díaz, 2006, pág. 2)

Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas esporas. (Díaz, 2006, pág. 2)

7.9 Microorganismos benéficos

Metarhizium puede coexistir en el mismo ambiente, estudios han demostrado que ambos hongos pueden ser utilizados en conjunto para el control biológico de plagas ya que presentan mecanismos complementarios de acción, su aplicación puede influir en la comunidad bacteriana del suelo, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas que contribuyen a la salud del suelo y de las plantas, Estas bacterias pueden ayudar en la descompensación de materia orgánica y en la supresión de patógenos. (López, 2019, pág. 3)

Asimismo, éste puede interactuar con hongos micorrícicos, formando asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas. Estas direcciones pueden mejorar la absorción de nutrientes y agua por parte de las plantas, además de proporcionar protección contra patógenos. (Pavone, Tecnovita, 2021, pág. 1)

Los microorganismos beneficiosos como Metarhizium pueden ser clave para promover prácticas agrícolas sostenibles. Estos hongos ofrecen una alternativa natural a uso de pesticidas químicos, ayudando al control de plagas y mejorando la salud del suelo. Al interactuar con otros microorganismos beneficiosos, Metarhizium también puede fomentar una mayor diversidad microbiana lo que contribuye a la estabilidad y resiliencia del ecosistema agrícola. Así el uso de estos microorganismos no solo reduce el impacto ambiental, sino que también favorece una agricultura más productiva y equilibrada. (López, 2019, pág. 3)

7.10 Utilización de los microorganismos benéficos en el suelo e Control biológico de plagas: Este hongo es ampliamente utilizado como biopesticida para el control de insectos plaga en cultivos agrícolas. Es eficaz contra una variedad de insectos como moscas blancas, chinches y orugas. Se aplica directamente sobre la plaga

o en el suelo, donde infecta a los insectos cuándo entran en contacto con el hongo.

(Figueroa-Rodríguez, 2019, pág. 2)

- Agricultura sostenible: Su uso en el manejo integrado de plagas ayuda a reducir la dependencia de pesticidas químicos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente también se usa para fortalecer la salud del suelo ya que su presencia pueda incrementar la diversidad microbiana. y mejorar la estructura del

(Ortega, 2023)

- Rehabilitación de suelos: En suelos contaminados o degradados se pueden aplicar productos con *Metarhizium* para mejorar la salud del suelo y combatir plagas que interfieren con la regeneración de la vegetación. (Pineda, 2020, pág. 47)

7.1] Identificación una identificación molecular

La identificación a nivel molecular se fundamenta en la composición de los ácidos nucleicos, priorizando esto sobre los resultados de su expresión. Estos procedimientos moleculares son frecuentemente aplicados junto con métodos tradicionales de identificación microbiológica. (Palomino Camargo, 2014)

Recientemente, se han creado innovadoras técnicas moleculares de tipificación que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual representa un notable progreso en la investigación de enfermedades infecciosas,

El método más confiable para identificar bacterias o hongos es la secuenciación de aquellas regiones de ADN que muestran variabilidad suficiente para diferenciar entre especies. Los segmentos que se amplifican y secuencian con mayor frecuencia incluyen los genes ribosomales (16S para procariontes y 18S para eucariotas), los espacios intergénicos (IGS) y los espacios internos transcritos (ITS) del grupo de genes ribosomales. (Palomino Camargo, 2014)

7.12 Identificación morfológica de hongos los hongos

Según Daza 2020, se identifica los hongos porque están formados por células eucariotas, a diferencia de las bacterias que consisten en células procariotas. Estos organismos pueden ser unicelulares, como las levaduras, o estar compuestos de múltiples células, como es el caso de las hifas, que son la base de los hongos filamentosos. Las hifas pueden presentar divisiones o septos constantes a cortas distancias (hifas septadas) o a mayores intervalos (hifas no septadas); estas últimas son conocidas como hifas cenocíticas, que pueden ser claras o de color oscuro (negras), denominándose hifas demateáceas. El conjunto de estas hifas se llama micelio y su disposición da lugar a la colonia del hongo. La mayoría de estos organismos son microscópicos y su nutrición está basada en la

obtención de compuestos carbonados. Se les clasifica como aeróbicos estrictos y, en situaciones particulares, como anaeróbicos facultativos.

Los hongos carecen de la habilidad para formar tejidos. Se les considera ubicuos ya que pueden adaptarse a diversos entornos: son capaces de colonizar suelo, agua e incluso aire. También se definen como organismos heterótrofos, ya que dependen de la materia orgánica producida por otros seres vivos que contienen energía, como carbohidratos, lípidos y grasas, y generan enzimas que les permiten absorber estos nutrientes. (Daza, 2020)

7.13 Métodos de identificación molecular

Las técnicas moleculares se fundamentan en la identificación del ADN del agente patógeno, lo que les confiere una gran especificidad. Los procesos de biología molecular incluyen la recolección, multiplicación y, más adelante, la identificación del ADN hallado en la muestra. (Bioser, 2022)

Hay diversos métodos moleculares, dependiendo del sistema de identificación empleado:

PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa: identificación mediante fluorescencia.

LAMP (Amplificación Isotérmica Mediadas por Bucle): identificación a través de bioluminiscencia, (Bioser, 2022)

La identificación morfológica de los hongos filamentosos presenta limitaciones considerables. En primer lugar, la visualización de las estructuras distintivas solo es posible si se cultiva el hongo bajo ciertas condiciones. No obstante, en el caso de los hongos filamentosos, la secuenciación de los ITS permite identificar menos especies que en el de las levaduras. Por ejemplo, para identificar *Aspergillus* y *Scedosporium* es necesario secuenciar el gen de la beta-tubulina, mientras que para *Fusarium* se requiere el gen que codifica el factor de elongación alfa. (Rodríguez, 2007)

7.14 Regiones Transcritas Internas (ITS)

Los segmentos que rodean al 5.8S son denominados ITS1 e ITS2, y nos referimos a la región ITS como la parte formada por ITS 1-5.8S»ITS2. El nombre ITS indica precisamente que se trata de una zona intermedia entre los ARNt, que se transcribe, lo que significa que se produce a partir del ADN. (Real Jardín Botánico, 2016)

7.15 ITS para la identificación molecular de hongos

En los setas, las secuencias de ITS se emplean como códigos de identificación de ADN, las cuales incluyen dos espaciadores internos transcritos conocidos como ITS1 e ITS4. La característica más importante de la secuencia ITS es que carece de genes incrustados en esa área, permitiendo su evolución sin limitaciones y, en consecuencia, sufre cambios con gran rapidez. Por esta cualidad, el ITS se utiliza para distinguir entre innumerables variedades de hongos. (Real Jardín Botánico, 2016)

8. VALIDACIÓN DE LA PREGUNTA

8.1 Pregunta Científica

¿Se podrá identificar morfológicamente y molecularmente la cepa de *Metarhizium* colectada en la zona del barrio Llano Largo parroquia El Chaupi?

9. METODOLOGÍA

9.1.0 Tipo de investigación

9.1.1 Investigación bibliográfica documental

Es una investigación bibliográfica ya que buscamos de datos primarios aquellos que el investigador obtiene directamente de la realidad investigada. Se obtiene básicamente mediante los documentos escritos correspondientes: libros, revistas, etc. También se caracteriza por la utilización de los datos secundarios como fuente de información ya que pretende encontrar soluciones a problemas planteados por una doble vía, relacionando datos ya existentes que proceden de distintas fuentes y proporcionando una visión panorámica y sistemática de una determinada cuestión elaborada en múltiples fuentes dispersas, sitios web o referencias bibliográficas.

9.2 Métodos de investigación

9.201 Cualitativo

La Investigación es cualitativa porque se centra en caracterizar la cepa de *Metarhizium* (como la forma, tamaño, color, textura) mediante su identificación y análisis molecular, no se enfoca en datos numéricos o mediciones estadísticas, sino en la naturaleza y características biológicas del hongo. Además, aunque menciona su potencial de biocontrol no se realiza un análisis cuantitativo de su eficacia, sino que se estudian sus propiedades y comportamiento de manera descriptiva.

9.3 Ubicación de la investigación

La presente investigación se realizó en la universidad técnica de Cotopaxi campus Salache, está dentro del perímetro rural cantón Latacunga, ubicada al suroeste de la cabecera cantonal, junto a la E35 en el km 7,53 vía Salache a 2,870 msnm su temperatura media es de 13,6⁰C.



Figura 1 Ubicación del laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Fuente: Google maps.

9.4 Recolección de muestras

Según Saavedra Oscar 2017, para realizar una muestra en suelo tiene que representar bien a todo el terreno por ello es muy importante que la muestra se tome de forma correcta en primer lugar debe identificarse si existen diferentes suelos en la parcela, (pág. 2)

Una vez identificado la zona a muestrear se suele seguir un zigzag de forma que se tome de toda la zona debe evitarse zonas donde se haya amontado diferentes productos químicos o que no sean típicos de la que se pretende muestrear. (Oscar, 2017, pág. 3)

Según Saavedra Oscar 2017, para tomar la muestra se hace de cavar un agujero del ancho de la pala o de la asada con una profundidad 10-15 cm en cultivos leñosos (arboles). (pág. 3)

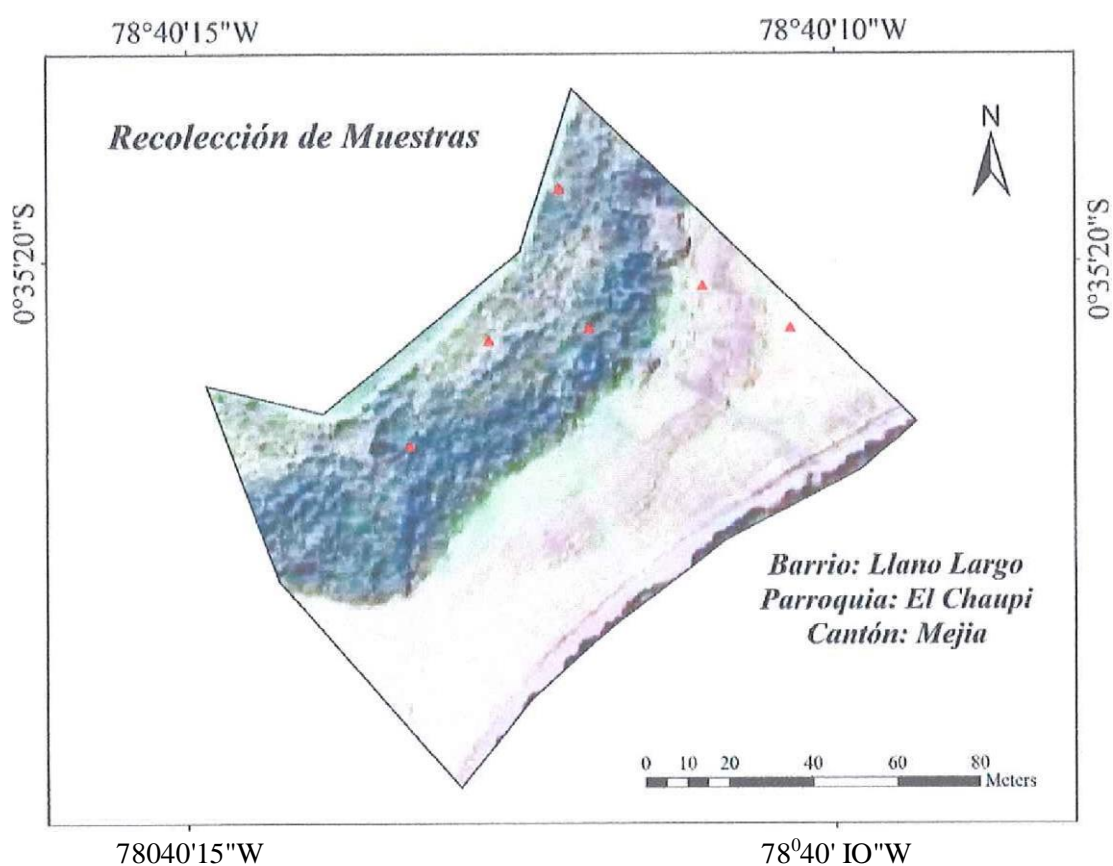


Figura 2 Ubicación de la recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en 6 zonas distintas de un mismo bosque. Cada muestra se colocó en bolsas Ziploc etiquetadas con la identificación correspondiente al lugar de

origen, garantizando un manejo adecuado para preservar las condiciones iniciales, se delimitaron cinco puntos en zigzag; en cada punto se tomó una muestra independiente de suelo de 600 g a una profundidad de 10 a 15 cm, lo cual de los cinco puntos se optó en mezclar todas las muestras y se llevó 200 g al laboratorio, por lo tanto se obtuvo 6 muestras y en total fueron

12 submuestras de las seis zonas las cuales se llevó a laboratorio.

9.5 Materiales y reactivos

9.5.1 Materiales

- Cajas Petri (50 unidades)
- Asa de siembra metálica (unidad)
- Estuche de disección (1 unidad)
- Papel absorbente (2 rollos)
- Papel aluminio (4 rollos)
- Mechero (2 unidades)
- Jeringuilla 10ml (5 unidades)
- Agua destilada (6 litros)
- Guantes quirúrgicos (1 caja)
- Papel film (30 metro)
- Puntas de micropipeta (100-200 HL)
- Microtubos (0.2-1.5 mL)
- Perlas de vidrio (4 unidades)
- Paratilm (1 rollo)
- Alcohol (70%)

9.5.2 Reactivos

- PDA
- Alcohol al 96% (8 litros)
- Agua destilada (5 litros)

• Buffer de extracción (500 HL)

• β -mercaptoetanol (2 HL)

Cloroformo (500 HL)

• Etanol (70% v/v)

• Acetato de sodio (3M)

• Agua ultra pura (50 HL)

• Dream Taq 2X (1205 μ L/Rx)

• Primer ITS1 (2.5 μ L/Rx)

Primer ITS4 (2.5 μ L/Rx)

• Agarosa (0.75g)

• Buffer Juice (50 μ L)

• Syber Safe (1.75 LIL)

Table 2 Equipos de laboratorio utilizados para elaborar la investigación.

| Equipos del laboratorio | Marca | Modelo | Cantidad |
|-------------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------|
| Autoclave | TUTTNAVER | 2540M | 1 |
| Incubadora | REBELK | RISO | 1 |
| Cámara de flujo laminar | BIOBASE | BBS-DDS. CN BBS-H1300 | 1 |
| Balanza | HOCHOICE | HC500 | 1 |
| Computadora | SAMSUNG | S19AION | 1 |
| Micropipeta | BOECO | M-200 HL | 1 |
| Espectrofotómetro | THERMO SCIENTIFIC | NANODROP 2000 | 1 |
| Congelador -20 ⁰ C | SOJ,,OW | | 1 |
| Termociclador | BOECO | TC-TE | 1 |
| Transiluminador | ENDURO GDS | ENDURO GDS | 1 |
| Fuente de poder y cámara d electroforesis | ENDURO | E0303 | 1 |
| Microondas | General Electric | JES710WK | 1 |
| Termobloque | BOECO | DBI-IOO | 1 |

| | | | |
|-------------|---------------------|-----------|--|
| Vortex | VORTEX,, GENEIE2 | S14236 | |
| Microscopio | OLYMPUS | CX31RBSFA | |
| Centrifuga | HERMLE | Z160M | |

Elaborado por: Aymacaña Stalin, 2024.

9.6 Aislamiento del hongo a partir de muestras de suelo

Se tomo muestras de suelo del barrio Llano largo se delimitaron cinco puntos en zigzag; en cada punto se tomó una muestra independiente de suelo de 600 g a una profundidad de 10 a 15 cm, lo cual de los cinco puntos se optó en mezclar todas las muestras y se llevó 200 g al laboratorio, por [o tanto, se obtuvo 6 muestras y en total fueron 12 submuestras de las seis zonas las cuales se llevó a laboratorio.

Se procedió a realizar disoluciones seriadas con factor 1:10, se pesó 10 gr de suelo y se afora a 100 mL con agua destilada y esterilizada (Disolución - 1), se colocó 9 mL de agua destilada y esterilizada en un tubo de ensayo y se añade 1mL de la disolución -1, se lleva agitación con ayuda de un vortex (Disolución⁻²).

Se realiza el mismo procedimiento y se añade 1mL de la disolución obteniendo la disolución se toma 60 HL de la disolución -3 y se coloca en una caja Petri con PDA, se rótula, se sella y se encuba a 27 °C por 7 días. (Cifuentes, 2008)

9.7 Métodos de multiplicación o Aislamiento

mediante corte de micelio

Con la ayuda de un bisturí se corta una parte de micelio con el objetivo de pasar al medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y de fomentar la expansión del hongo en el medio. Este enfoque aumenta el número de colonias formadas lo que tácilita el proceso de purificación, cuanto mayor sea la cantidad de colonias obtenidas mejor será la calidad de la muestra para su posterior análisis molecular, asegurando resultados más confiables y detallados. (Demo,

Según Crisol. 2023, son mayormente utilizados para prácticas de laboratorio, es un instrumento que permite hacer cortes precisos para separar muestras de materia y analizar sus componentes.

• Siembra por estría

Se utiliza un asa de siembra para arrastrar una pequeña cantidad de muestra sobre la superficie de la caja Petri con PDA. (Demo, 2015)

Las asas de siembra se usan en los laboratorios de microbiología para la transferencia de forma estéril y segura de bacterias en medios de cultivo ya sea en placa o en tubo. Pueden ser de plástico, metálicas o de cristal. En función del material, el asa será estéril de un solo uso o bien se deberá esterilizar con una llama en cada uso, (Scharlab, s.f.)

Este material ayuda para el sembrado ya que el hongo pocas de las veces se hacen polvoriento o en forma de estrías ya que este material nos facilita la transferencia de forma estéril y segura de bacterias el medio de cultivo,

Aislamiento de Metarhizium

Se realizó en las instalaciones del Laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi con todas las medidas de bioseguridad y con los equipos con los que cuenta el laboratorio.

Para la preparación de medio de cultivo se preparó en 400 ml de agua destilada 15,6 g de (PDA) para 20 cajas Petri, asas de siembra, pinzas deben ser coloca en el autoclave con un tiempo de 45 minutos a una temperatura 120 °C para la esterilización y preparación del medio, se lo sacamos de la autoclave para que se enfrié hasta. eso debemos desinfectar la cámara de flujo laminar donde se debe trabajar con las muestras y todos los materiales necesarios como: mechero con alcohol al 96%, cajas Petri de 60 x 15 mm, alcohol al 96% en un vaso de precipitación para la desinfección de asas de siembra y pinzas, para el aislamiento. (2023)

Fórmula para la preparación de medio de cultivo (PDA)

$$\frac{1000\text{ml} \text{ --- } 39\text{g}}{200 \text{ --- } \text{---} \text{---} X} = X = \frac{400 \text{ --- } 39}{1000} \text{ --- } 15.6\text{g}$$

Se aplico cloranfenicol ya que ejerce su efecto principal en células bacterianas por inhibición de la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 50S ribosomal impidiendo la adición de aminoácidos durante el ensamblaje de la cadena de peptídica.

(Ministerio de Salud

Publica, 2016)

Interfiere en la síntesis proteica bacteriana es de amplio espectro frente a bacterias grampositivas y negativas, incluyendo anaerobios y espiroquetas, (Pediatria, 2020)

Se colocaron en cada caja Petri 20 ml de (P.DA), se esperó dos minutos para que el medio se enfríe. Se utilizaron varias técnicas de multiplicación como es con pinzas y asa de siembra luego de haber multiplicado, serán rotulados con fecha, numero de muestra, nombre del responsable, el medio de cultivo que se utiliza lo sellamos con papel film y lo llevamos a la incubadora a 27⁰C por 7 días. (Guamantaquí, 2024)

9.8 Extracción de ADN

9.8.1 Protocolo de extracción de ADN

A partir del crecimiento de hongos puros en medio PDA, se tomó aproximadamente 504 00 mg de micelio y se colocó en un microt.ubo de 2 mL, que contenía 200 gL de PBS, se centrifugó por 2 minutos a 12000 rPiT1. Se añadieron tres perlas de vidrio, 500 l.1.11 de buffer de extracción (Tris HCl 100 Mm, EDTA 20 mM, CTAB w/v, NaCl 14 M, pH 8) y 2 kIL mercaptoetanol. Se realizó disrupción mecánica usando un vortex durante 30 segundos para lograr una mejor maceración. Se incubó en un termobloque a 60⁰C por 30 minutos, invirtiendo los tubos en lapsos de 10 minutos. Se añadió 500 PL de cloroformo frío y se homogenizó con vórtex. Se dejó reposar por 2 minutos y se centrítUgó a 12000 rpm por 8 minutos con el objetivo de separar la solución en fases. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 mL y se agregó un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 HL de acetato de sodio 3M y 300 VIL de etanol 70%, para lograr la precipitación del ADN. Se dejó reposar durante 2 horas a -20⁰C. Se centrifugó a 12000 rpm por 17 minutos, obteniendo al tondo del tubo el pellet que contenía el ADN, se

descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados utilizando 500 PL de etanol al 70% y un tercer lavado con 500 VIL de etanol al 96%. Se dejó secar las muestras con el flujo de aire de la cámara por un tiempo de 30 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 de agua ultrapura. Se llevó a incubación por 30 minutos a 37⁰C. El ADN fue almacenado a 20⁰ C (Flores, 2021).

Se preparó un gel de agarosa al 1% y se realizó una corrida electroforética a 110 V durante 30 minutos con el objetivo de visualizar la calidad del ADN.

EL ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000c. Se obtuvo la concentración de cada muestra en ng/11L y los ratios 260/230 y 260/280.

9.9 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Para la PCR se utilizaron 3 microtubos, los cuales pertenecían a la muestra M8 (*Metarhizium*), al control positivo y al control negativo, se utilizó la enzima Dream Green Taq (Thermo Scientific, 2016). Se preparan reacciones con un volumen final de 2,5 VIL por cada reacción, que contenía 12.5 VIL de Dream Green Taq 2X, 2,5 HL de cada Primer ITS1 e ITS4, 2.5 VIL de agua ultra pura y 5 gL de ADN de cada muestra o control. La amplificación se realizó en el termociclador Boeco TC.,TE, utilizando el perfil térmico de Denaturación a 95 ⁰C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de Denaturación a 95 ⁰ C por 3 segundos, Annealing a 55 ⁰ C por 30 segundos y Extensión a 72⁰ C por 1 minuto, se estableció una extensión final a 72⁰ C por 5 minutos y en un tiempo de espera a 4⁰ C (White, 1990).

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% (p/v), disolviendo 0.75 g de agarosa en 50 ml de TAE IX y se incorporó 1 HL de Syber Safe.

Una vez solidificado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis con los pocillos orientados hacia el polo negativo y se llenó la cámara con TAE IX. Se cargó el marcador de peso molecular de 100bp en el primer pocillo, en los siguientes pocillos se añadieron 5 HL de control negativo, 5 VIL de la muestra M8 (*Metarhizium*) y 5 HL de control positivo. La electroforesis se llevó a cabo a 110V durante 30 minutos.

9,10 Análisis Bioinformático

Los productos de amplificación de la región ITS fueron enviados a IDgen ser secuenciados utilizando la técnica de Sanger, Los resultados fueron proporcionados en formato FASTA junto con los electroferogramas correspondientes* Para la identificación molecular, las secuencias sin procesar fueron analizadas con el software Geneious Prime v2025. 0, donde se eliminaron las áreas de baja calidad y se llevó a cabo un alineamiento de novo con las secuencias ITS1 e ITS4 de cada uno de los ejemplares. Luego, se verificó el alineamiento y se generó una secuencia consenso. (Torres, 2014)

La secuencia consenso fue comparada con todas las secuencias disponibles en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar el organismo correspondiente.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Observación macroscópica de *Metarhizium*

Observación macroscópica durante los 7 días de crecimiento del hongo *Metarhizium* con una temperatura de 27⁰ C en la incubadora. (Guamantaqui, 2024)

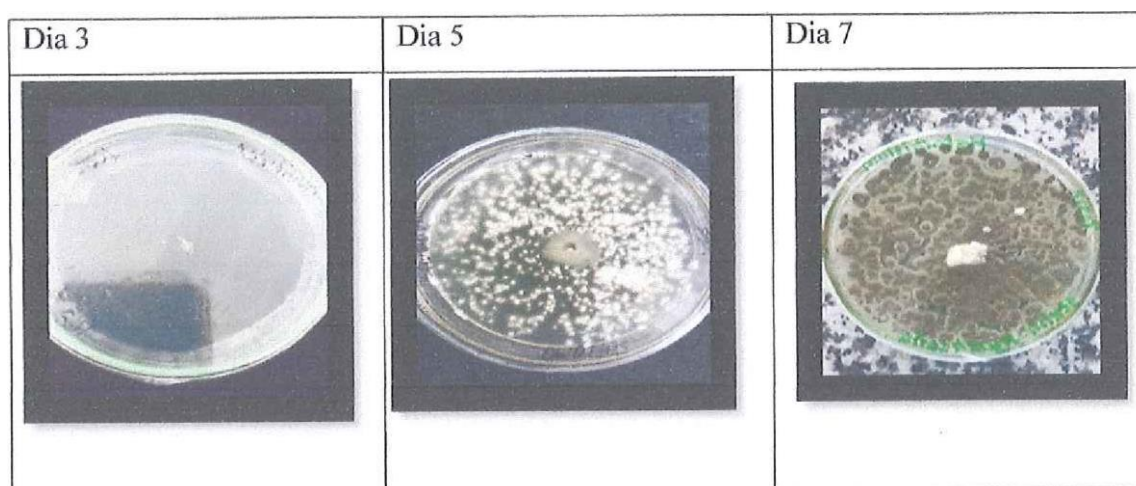


Figura 3 Crecimiento radial de (*Metarhizium*), en medio de cultivo PDA durante los 7 días de desarrollo,

Crecimiento del hongo al día 3:

En la caja Petri de *Metarhizium* sembrada en agar PDA (Potato Dextrose Agar) a los dos días a una temperatura de 27⁰C no se aprecia a simple vista esporulación ninguna.

Crecimiento del hongo al día 5

Las colonias de *Metarhizium* en la caja Petri al día 5 se aprecia un crecimiento y expansión del micelio color blanco, mostrando un aspecto más denso (como se aprecia en la figura 3, día 5), el crecimiento de *Metarhizium* es continuo formando colonias a un más extendidas donde ya se pueden distinguir pequeñas estructuras reproductivas como conidios o esporas. (Ramirez S. B., 2017, pág. 2)

Crecimiento del hongo al día 7

Las colonias de *Metarhizium* en el día 7 en la caja Petri se aprecia un crecimiento máximo cubriendo gran parte del agar con su característico crecimiento de hifas, su desarrollo es estable y se nota sutiles cambios en el color y la textura esto da señales que pronto comenzará la producción de esporas maduras.

Según Ramirez 2017, los aislados de *Metarhizium ssp* provenientes del hongo entomopatógeno mostró colonias inicialmente de color blanco que luego se volvieron de color verde claro.

Es importante recordar mantener las condiciones adecuadas de humedad, temperatura y nutrientes para favorecer el crecimiento de *Metarhizium* en la caja Petri, (Flores, 2022, pág. 8)

10.2 Observación microscópica de *Metarhizium*

Para la identificación del hongo que fue cultivado y aislado en el laboratorio de Salache de la Universidad Técnica de Cotopaxi, el día 14 de enero del 2025, se mantuvo en incubación durante un periodo de 7 días a una temperatura de 27⁰C. (Guamantaqui, 2024)

Posteriormente, se obtuvieron muestras del hongo aislado mediante el uso de un asa, se colocó sobre portaobjetos y se protegió con un cubreobjetos. Luego, se colocaron los portaobjetos en el microscopio utilizando el lente (20x/0,40Ph1.) con el objetivo de observar las estructuras que se formaron durante su crecimiento en el medio de cultivo.

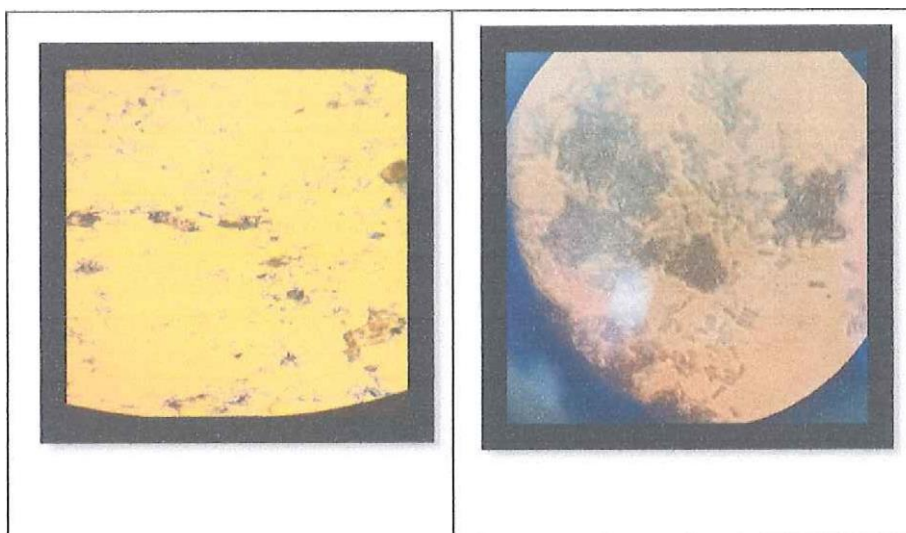


Figura 4 Visualización de Metarhizium en el microscopio,

En el microscopio, se puede observar que Metarhizium es un hongo entomopatógeno con una apariencia filamentosa. Sus conidios son forma ovalada, sus hifas son filamentos septados y ramificadas que conforman el micelio del hongo, tal como se ha indicado en quién menciona que las colonias presentan una estructura similar al algodón de color blanco que se transforma en tonos verdes grisáceo durante la población formando halos o anillos concéntricos. (Ramirez H. G., 2014, pág. 13; Guamantaqui, 2024)

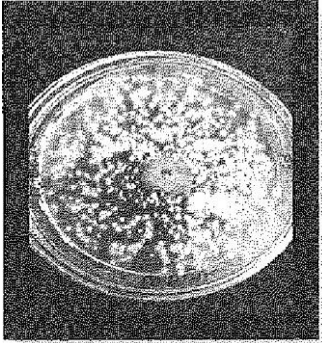
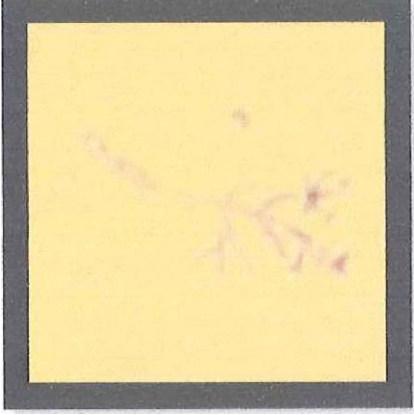
También se pueden observar esporas de forma ovalada o alargada, que son las estructuras reproductivas del hongo, En genet'eth Metarhizium presenta una apariencia similar a otros hongos filamentosos, pero su capacidad para infectar insectos lo distingue de otros géneros fúngicos. Ya que tiene estructuras como micelio, conidióforos y conidios. (Ibarra, 2022, pág. 45)


10.3 Identificación morfológica de Metarhizium

Este hongo entomopatógeno es ampliamente utilizado en la agricultura para el control de insectos perjudiciales, ya que infecta y mata a numerosas especies de la misma.

Tabla 3 Características morfológicas de Metarhizium vistas a través del microscopio

| Partes | Descripción | Fotografía |
|--------|-------------|------------|
| | | |

| | | |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Micelio</p> | <p>Según (Ramirez H. G., 2014, pág. 13; Guamantaqui} 2024), las colonias son blancas o cremas algodonosas, micelio apegado al sustrato.</p> <p>Sus hifas son filamentos septados y ramificado diámetro puede variar entre 2 y 4 micrómetros, mientras que la longitud puede extenderse desde unos pocos micrómetros hasta varios centímetros, dependiendo de las condiciones de crecimiento,</p> |  |
| <p>Conidióforos</p> | <p>Los conidióforos pueden tener una longitud que va desde 50 hasta 200 micrómetros, y un diámetro de alrededor de 2 a 5 micrómetros, nuevamente dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento, (Ramirez H. G., 2014, pág. 13; Guamantaqui, 2024)</p> |  |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Conidios | Los conidios son de forma ovalada y tienen una longitud que oscila entre 5 y 9 micrómetros, y un diámetro de 3 micrómetros. Estas medidas también pueden variar según la especie y las condiciones ambientales. (Ramirez H, G., 2014, pág. 13; Guamantaqui, 2024) |  |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|

10.4 Identificación molecular

10.4.10 Extracción y Cuantificación de ADN

Para verificar la calidad del ADN extraído de la muestra M8 (Metarhizium) se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb y cargando las muestras de ADN con Blue Juice y se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro NanoDrop One^c, midiendo la absorbancia a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Se evaluó la pureza mediante las relaciones 260/280 y 260/230. Según Rodríguez 2020, la relación 260/280, cuyos valores ideales se sitúan entre 1.8 y 2,0 (valores menores pueden indicar contaminación por fenol o proteínas, y valores superiores, la presencia de ARN), el espectrofotómetro registró un valor de 2.04 para la muestra M8 (Metarhizium). De igual manera, la relación 260/230 debe encontrarse entre 1.8 y 2.2 para asegurar la ausencia de contaminantes como sales caotrópicas o carbohidratos. La muestra M8 (Metarhizium) arrojó un valor de 1.70 lo que indica que existe cierta presencia de contaminantes, pero no afectan la calidad del ADN (Figura 5).

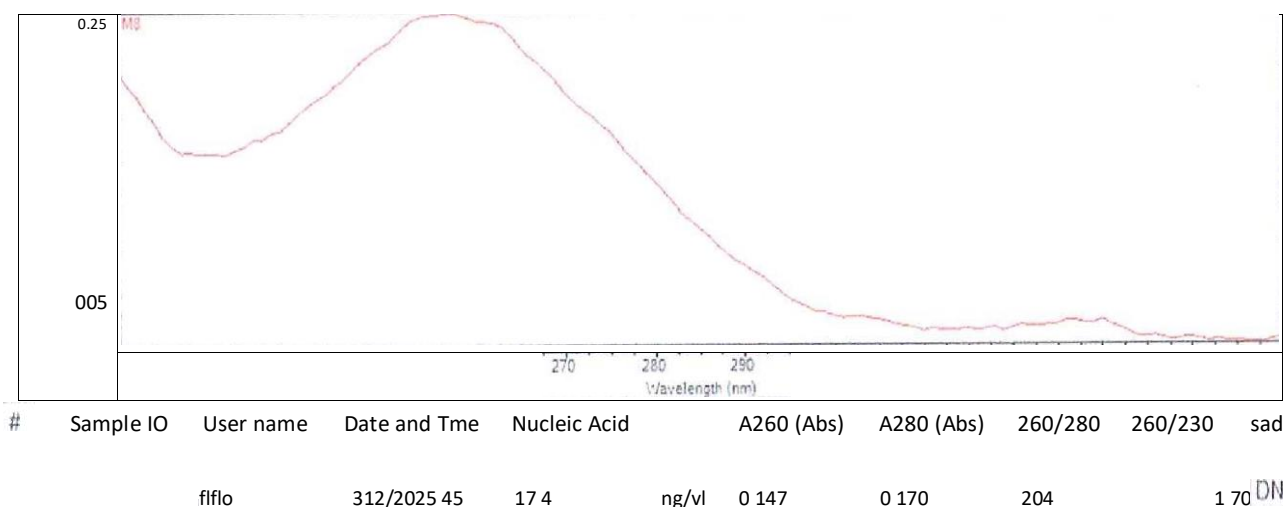


Figura 5 Resultados de cuantificación de ADN a través de/ equipo A/citroDrop One^d.

10.4.2 Amplificación de la región ITS por PCR

Posteriormente, se realizó la amplificación de la región delimitada por los primers ITS1 e ITS4. Según Heredia 2022, las regiones ITS son los marcadores de nucleótidos más adecuados para el análisis filogenético de hongos ya que permite determinar el género y la especie.

La calidad de las amplificaciones obtenidas se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5^o/0. Al observar la migración de las bandas en el gel, junto con un marcador de peso molecular con fragmentos de tamaño conocido, se confirmó que los fragmentos amplificados alcanzaron el tamaño esperado de 600 Pb. Como resultado, se obtuvieron los datos que se presentan en la figura 6.

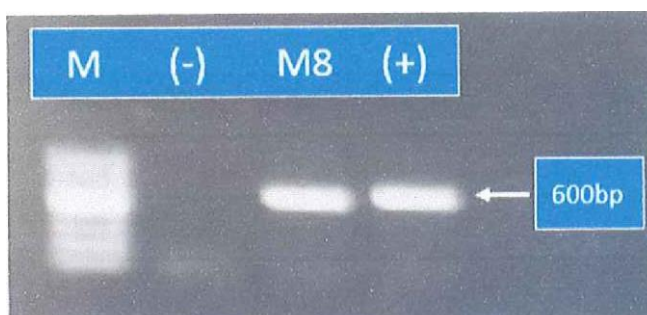


Figura 6 Electroforesis de fragmentos ITS amplificados por PCR. M: Marcador de peso molecular de 100bp, G): Control negativo, 148: Metarhizium, Control positivo.

1004,3 Análisis bioinformático

Para la identificación molecular, se cargaron los datos de las secuencias crudas en el software Geneious Prime v2025.0. Una vez eliminadas las secuencias de baja calidad se obtuvo un porcentaje de calidad (HQ) de la muestra Metarhizium del 95% y una longitud de 517bp (Figura 7). Finalmente, se obtuvo la secuencia de consenso.



Figura 7 Análisis de las secuencias ITS de la muestra 11/18 en el software Geneious prime v2025.0.

Se realizó un análisis BLAST de la secuencia consenso obtenida utilizando la base de datos públicas del NCBI para identificar el microorganismo con mayor grado de identidad. Los resultados indicaron que la muestra M8 corresponde a la especie *Metarhizium anisopliae* con un 100% de identidad y un porcentaje de cobertura (query cover) del 99.61 % (Figura 8).

| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per Ident | Acc Len | Accession |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-----------|---------|------------|
| Metarhizium sp. strain GH15 strain subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5' | <i>Metarhizium sp.</i> | 944 | 944 | 100% | 0.0 | 99.61% | 556 | MG020621.1 |
| Metarhizium anisopliae strain FRIL1 isolate FRR105 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S rDNA | <i>Metarhizium anisopliae</i> | 944 | 944 | 100% | 0.0 | 99.61% | 520 | MG020715.1 |
| Fungal sp. isolate 27-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S rDNA gene and internal tran | <i>Fungal sp.</i> | 944 | 944 | 100% | 0.0 | 99.61% | 534 | OR457605.1 |
| Metarhizium anisopliae isolate CNQ04-10S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5' | <i>Metarhizium anisopliae</i> | 942 | 942 | 100% | 0.0 | 99.61% | 1204 | FJ545279.1 |
| Metarhizium anisopliae culture CBS 127626 strain CBS 127626 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen | <i>Metarhizium anisopliae</i> | 942 | 942 | 100% | 0.0 | 99.61% | 693 | ML050152.1 |

Figura 8 Resultado de/ alineamiento de la secuencia consenso versus las secuencias de/ NCBI utilizando la herramienta BLAST

El análisis molecular permitió realizar la caracterización genética del hongo a través del estudio de la región ITS (Gavilanes, 2021). La identificación molecular permitió determinar que la muestra analizada contenía una única cepa purificada de *Metarhizium anisopliae*, lo que sugiere una identificación precisa de la especie objetivo.

11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

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

11.1 Impacto social

El hongo *Metarhizium* reduce el uso de pesticidas químicos, promoviendo una producción agrícola más ecológica, además ayuda a controlar plagas como la mosca blanca (*Bemisia fabaci*), que afecta cultivos esenciales, asegurando mejores rendimientos y calidad de los alimentos favoreciendo a pequeños y grandes agricultores al proporcionar una alternativa natural y efectiva para el control de plagas.

Disminuye la exposición a pesticidas sintéticos, reduciendo riesgos de intoxicaciones en agricultores y consumidores y esto contribuye a la producción de alimentos más saludables, sin residuos químicos perjudiciales.

11.2 Impacto económico

El uso de *Metarhizium* como posible biocontrolador dará una gran ventaja ya que resalta un valor económico en la protección de cultivos, promoviendo prácticas agrícolas más sostenibles y económicamente viables, beneficiando a las familias agricultoras al reducir las

pérdidas causadas por esta plaga y el agricultor tendrá más oportunidad de comercio de productos orgánicos para la industria*

11.3 Impacto ambiental

La aplicación de pesticidas químicos para el control de plagas genera problemas ambientales como la contaminación del suelo y el agua, así como la afectación a organismos no objetivo. En este contexto, *Metarhizium* surge como una alternativa de biocontrol eficaz y ecológica. Este hongo permite reducir el uso de agroquímicos, minimizando su impacto ambiental y promoviendo prácticas agrícolas sostenibles. Además, su especificidad en el control de insectos reduce los riesgos para la biodiversidad favoreciendo el equilibrio ecológico sin comprometer la productividad agrícola.

12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Tabla 4 Costos del proyecto de investigación.

| Materiales | Cantidad | Precio | Total |
|----------------------------|-----------|---------|----------|
| Medio de cultivo (PDA), | 1 | \$45.00 | \$45,00 |
| Mechero de alcohol. | | \$5.00 | \$5.00 |
| Papel absorbente | 3 | \$2.75 | \$8.25 |
| Guantes quirúrgicos | Una caja | \$3,00 | \$3.00 |
| Parafilm | Una caja | \$60,00 | \$60.00 |
| Alcohol 70% | 4 | \$5.00 | \$20.00 |
| Alcohol 96% | 3 | \$8.00 | \$24.00 |
| Tijera | 1 | \$0.50 | \$0.50 |
| Marcador | 1 | \$1.00 | \$1.00 |
| Agua destilada | 3 galones | \$5.00 | \$15.00 |
| Papel aluminio | 2 | \$2.75 | \$5.50 |
| Cajas Petri cristal grande | 60 | \$2.50 | \$150.00 |

| | | | |
|-------------------------|----------|---------------------------|-----------|
| Estuche de disección | 1 | \$16.00 | \$16.00 |
| Asa de siembra | 1 | \$20.00 | \$20.00 |
| Bisturí | Una caja | \$ 10.00 | \$10.00 |
| Plástico film | Un rollo | \$5,00 | \$5.00 |
| | | Total Total | \$388.25 |
| | | | |
| Materiales | Cantidad | Precio | Total |
| Micropipeta | 2 | \$35.65 | |
| Puntas de micropipeta | 2 cajas | \$36.25 | \$72.50 |
| Microtubos | Una caja | \$10.25 | \$10.25 |
| Microondas | | | \$1 15.00 |
| Centrifugador | 1 | \$464,00 | \$464,00 |
| Vortex | 1 | \$95.00 | \$95.00 |
| Incubadora de baño seco | 1 | \$182,00 | \$182.00 |
| Fuente de poder | 1 | \$100.00 | \$ 100.00 |
| Computadora | 1 | \$655.00 | \$655.00 |
| Transiluminador | | | |
| Termociclador | | \$ | |
| Incubadora | 1 | | |
| Blu jeice | | | |
| Agarosa | 1 | \$ | |
| SYBR | | | \$ |
| Agua ultra pura | | | \$ |
| | | \$ | |

| | | | |
|------------------|----|-----------------------------|------------|
| TAE | 1 | | |
| Perlas de vidrio | 1 | | \$ |
| Tris HCL | 1 | | \$ |
| EDTA | 3 | | |
| | 1 | | |
| CTAB | | | |
| MCL | | | |
| Mercaptoetanol | 1 | \$ | |
| Cloroformo | 1 | \$ | |
| Etanol | 1 | \$ | |
| Acetato de sodio | 1 | \$ | |
| OTROS COSTOS | | | |
| Alimentación | 50 | \$5.00 | |
| Transporte | 50 | \$3.00 | |
| | | Total | \$25165.05 |
| | | Total, de la investigación. | \$2,593.03 |

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1 Conclusiones

' En conclusión, se identificó la presencia de *Metarhizium* en las muestras de suelo de] barrio Llano Largo se observa macroscópicamente gran expansión de micelio mediante sutiles cambios en el color y su textura. Por otro lado, también se evidencia microscópicamente la forma de sus conidios, hifas ramificadas, esporas, micelio y conidióforos lo cual estas son sus estructuras reproductivas del hongo,

- Mediante la observación del microscopio, se verifico la morfología del hongo *Metarhizium*, mediante el análisis de cuantificación de ADN, en la muestra analizada presenta relaciones de absorbancia dentro de los rangos ideales, lo que indica que el ADN extraído está adecuadamente purificado y es apto para procedimientos posteriores de amplificación y ratifico el laboratorio IDGEN, lo que confirmo, que era *Metarhizium anisopliae*.

13,2 Recomendaciones

- Se recomienda desarrollar métodos alternativos más accesibles y económicos para la reactivación purificación e identificación de *Metarhizium*, especialmente adaptados a las necesidades de ayicultores y pequeñas comunidades agrícolas, también se recomienda usar el bistu*í como medio de propagación en las cajas Petri dado los bajos niveles contaminación.
- e Se recomienda que la cepa de *Metarhizium* se evalué en campo, en el control de plagas agrícolas para poder saber su potencial de biocontrol.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, A. O. (06 de 09 de 2024). Instituto Entoma Obtenido de <https://www.entoma.org/trips/ciclo-de-vida-moscas-blancas/>
- Ati, P. F. (2009), Bioquímico Farmacéutico. En P. F. Ati.
- Bernays. (2004). Obtenido de [https://es.wikipedia.org/wiki/Bemisia tabaci](https://es.wikipedia.org/wiki/Bemisia_tabaci)
- Bioser. (12 de 0 de 2022). Obtenido de <https://www.bioser.com/metodos,,moleculares-para,,la-deteccion-de-patogenos-la-herramienta-mas-versatil-para-tu-laboratorio/>
- Bravo, K. V. (21 de 09 de 2023). Universidad Politecnica Salesiana . Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/26052/1/UPS-CT010877.pdf>
- Cifuentes, L. (06 de 2008). Pontificia Universidad Javeriana, Obtenido de <https://repositotyjaveriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf>

- Crisol. (26 de 06 de 2023). Obtenido de <https://elcrisol.com.mx/blog/post/instrumentos-de-laboratorio-15-esenciales-en-escuelas#:~:text=Bisturí,materia%20y%20analizar%20sus%20componentes>
- Daza, F. G. (2020), Características generales de los hongos. Experto en Medicina Tropical.
- Demo, M. (26 de 05 de 2015), Unirio. Obtenido de <https://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2018/11/978-987-688-124-I.pdf>
- Díaz, M. (12 de 2006). Scielo . Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006
- Jimbi, S., Maniana, Ns, & Lux, S. y. (2022). Universidad de Colima, Obtenido de Potencial de hongos entomopatógenos para el manejo de la araña roja: <https://www.redalyc.org/journal/837/83774209004/html/>
- Estalyn, N. s. (2023). repositorio Obtenido de <https://repositorio.utc.edu.ec/server/api/core/bitstreams/110797ce-bc68-4413-a2143cb91da1f899/content>
- F, F. (2021). Protocolo para la identificación molecular de microorganismos. IDge.n.
- Figueroa^mRodríguez, K. A. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisoplae* en los últimos 40 años . Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas . [fishersci. ?fic. \(29 de 01 de 2025\). Obtenido de https://www.fishersci.es/shop/products/dreamtaq-pcr-master-mix-2x-2/11816843](https://www.fishersci.es/shop/products/dreamtaq-pcr-master-mix-2x-2/11816843)
- Flores, W. Y. (22 de 02 de 2022). repositorio utmachala* Obtenido de <https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/18567/1/TTUACA-20224A-DE00003.pdf>
- Gallardo, M, (19 de 05 de 2022). Obtenido de <https://multiplag.com/blogs/informacion-de-plagas/como-eliminar-mosca-blanca?srsltid=AfmBOooHTEp2TFciSTwnXT4MTUN11uzOcln4yOACqbgghliyaLAPhwQ6>

- García-Pacheco, L. A. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae*. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, 2. doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>
- Gavilanes, D. M. (2012). *ResearchGate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/357468536_Isolation_and_molecular_characterization_of_phytoplankton_strains_obtained_in_Engabao_Guayas-Ecuador
- Guamantaqui, (2024). *repositorio*. Obtenido de <https://repositorio.utc.edu.ec/server/api/core/bitstreams/8255bb7e75ac49c091a7148117c64349/content>
- Gurr, G. M. (2000), El papel de los insectos en el manejo integrado de plagas: estrategias alternativas de control. En *Ciencia en insectos y aplicación*,
- Heredia, (2022). *Labsergežfl*. Obtenido de http://labsergen.langebio.cinvestav.mx/genomics/?page_id=3186
- Hernández, J. A. (2020). *Control Biológico*. Obtenido de <https://acaentmex.org/entomologia/revista/2020/CB/Em%20CB%2087-92.pdf>
- Hernández, M. d. (19 de Diciembre de 2019). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Obtenido de <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/forestales/article/download/496/1809?inline=1>
- Ibarra, A. M. (2022). Aislamiento, identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas, *Revista Colombiana de Entomología*.
- Intagžri (2008). Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/fltosanidad/manejo-integrado-de-la-gallina-ciega>
- Jimenez, (2012). Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/rca/v31n3/v31n3a1.pdf>

- Jiménez, M. A. (08 de 2015). Scielo . Obtenido de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992015000300001&script=sci_arttext&utm_source
- Koppert, J. (2020). Koppert Obtenido de <https://www.koppert.ec/plagas-en-plantas/psilidos/paratrioza-pulgón-saltador-de-la-papa-tomate/#:~:text=El%20principal%20da%C3%B1o%20directo%2C%20ocasionado,hojas%2C%20entrenudos%20y%20frutos%20de>
- Loma, (19 de 05 de 2023). multiplag. Obtenido de <https://multiplag.com/blogs/informacion-de-plagas/como-eliminar-moscablanca?srsltid=AfmBOooHTEp2TFciSTwnXT4MTUNlluzOcLn4yOACqbghliyaLAPhwQ6>
- López, (05 de Scie/o . Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019000100038&script=sci_arttext&utm_source
- Ministerio de Salud Publica, s. (11 de 2016). Obtenido de https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/19495/FichaTecnica_19495.html.pdf
- multiplag. (19 de 05 de 2023). Obtenido de <https://multiplag.com/blogs/informacion-de-plagas/como-eliminar-mosca-blanca?srsltid=AfmBOooHTEp2TFciSTwnXT4MTUNlluzOcLn4yOACqbghliyaLAPhwQ6>
- Ortega, R. P. (2023). nostocbiotech Obtenido de <https://nostoc.es>
- Oscar, S. (2017). ¿Como tomar muestras de suelo? Agrocabilido, 2.
- P., F. M. (2007). Scielo. Obtenido de Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types
- Pacheco, J. (19 de 05 de 2023). Obtenido de <https://multiplag.com/blogs/informacion-de-plagas/como-eliminar-mosca->

- blanca?srsftid=AfmBOooHTEp2T_FciSTwnXT4MTUN11uzOcLn4yOACqbghliya
LAPhwQ6
- PalominoCamargo, C, (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones, Scielo, 3.
- Pavone, D. (09 de 2021). Tecnovita. Obtenido de [https://tecnovitaca.com/wpcontent/uploads/202109/Metathizium-1 .pdf](https://tecnovitaca.com/wpcontent/uploads/202109/Metathizium-1.pdf)
- Pavone, D. (03 de 09 de 2021 Tecnovita. Obtenido de https://tecnovitaca.com/metarhizium-endofito-entomopatogeno/?utm_source
- Pediatría, A. E. (01 de 12 de 2020). Obtenido de <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/cloranfenicol#:~:text=Descripci%C3%B3n%3A,%2C%20Chlamyphila%2C%20Mycoplasma%20y%20Rickettsia.>
- Pedraza, F. S. (20 t 5). E/ctividad de hongos entomopatogenos . Mexico .
- Perez, N. (s,f.). BIOPLAGUICIDAS: UNA OPCIÓN PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS. Ra Ximhai, 17-29,
- Phytoma . (2020). Obtenido de <https://certisbelchim.es/mosca431anca%que«es»y-como-se,,combate/>
- Pinedas A. (2020). El uso de microorganismos beneficiosos del suelo en el control de plagas. Transferencia Tecnológica .
- Publico, D. (2020). DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL Obtenido de https://www.gob.mx/Jcms/uploads/attachment/file/600965/Mosquita_blanca.pdf
- Ramirez, H. G. (2014). Senasa Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual,,de-Producci3n-y-Uso,,de-HongosEntomopat3genos.pdf>
- Ramirez, St B. (2017). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva* andigena (Hemiptera: Cercopidae). Agrosavia.
- Rau15 G. (1990). Pest Status and Managment . The morphology ofwhi.teflies, 47^{M9}().
- Real Jardin Botanico . (20 de 05 de 2016), Obtenido de <https://rjb.csic.es/el-codigo-de-adn-en-hongos-no-es-perfecto/#:~:text=Lo%20m3s%20relevante%20de%20la,miles%20de%20especies%20de%20hongos>

- Rodríguez, L. (2007). Seimc, Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2007micologia2.pdf>
- Rodriguez, L. (06 de 10 de 2020). Sciel a Obtenido de [https://www.scielo.org.mWscielo.php?script=sci_arttext&pid=S20\(7-093420180010001691#:~:text=Además%20de%20obtener%20la%20cantidad,proteínas%20presentes%20en%20la%20muestra](https://www.scielo.org.mWscielo.php?script=sci_arttext&pid=S20(7-093420180010001691#:~:text=Además%20de%20obtener%20la%20cantidad,proteínas%20presentes%20en%20la%20muestra)
- Rosas, F, H. (2019). Análisis de las investigaciones sobre "Metarhizium anisopliae" en los últimos 40 años, Dialnet, 155 156.
- Ruiz, E. (04 de 2013). Scielo Obtenido de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0065-17372013000100008#:~:text=20\).- ,Bemisia%20tabaci.,entre%20los%20dos%20grupos%20\(Fig.](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0065-17372013000100008#:~:text=20).- ,Bemisia%20tabaci.,entre%20los%20dos%20grupos%20(Fig.)
- Scharlah. (s.f.). Obtenido de <https://www.scharlab.com/in/es/consumible/asas•siembra#:~:text=Las%20asas%20de%20siembra%20se,plástico%2C%20metálicas0/02000/020de%20cristal>
- Taylor, (06 de 1990). researchgate. Obtenido de [file:///D:/Usuarios/User/Downloads/white 1990%20\(I pdf](file:///D:/Usuarios/User/Downloads/white 1990%20(I pdf)
- thermo scientific. (23 de 12 de Obtenido de file:///D:/Usuarios/User/Downloads/MAN0012704_DreamTaq_Green PCR_Master Mix_K1081 UG.pdf
- Torres, J. (Mayo de 2014). researchgate Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/330935000_ANALIZ_POSLEDOVATEL_NOSTEJ_VNUTRENNIH_TRANSKRIBIRUEMYH_SPEJSEROV_ITS1_ITS2_1_RIBOSOMNOGO_GENA_58S_VIDOV_RODA_AMARANTHUS Analysis of the sequences of internal transcribed spacers ITS1 ITS2 and the 58S_1
- Ugine, (2019). biocontrol.entomology. Obtenido de <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/Metarhizium.php>
- Urbina, A. (09 de 2023). cambiagro . Obtenido de <https://blog.cambiagro.com/proteccion-y-bioestimulacion/mosca-blanca-ciclo-de-vida-danos-y-control-en-hortalizas/>

Valarezo, O. (30 de Junio de 2008). La grama. Obtenido de <https://lagrania.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/7.2008.03#resultados%20de1%20diagn%C3%B3stico%20indican,cultivos%20de%3A%20pimiento%2C%20tomate%2C>