

**UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



**Título a obtener:**  
INGENIERA AMBIENTAL

**Título del Proyecto de Investigación:**

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Metarhizium* spp.  
EN SUELOS DE CULTIVOS DE CAÑA DE AZÚCAR DE LA PARROQUIA  
TARQUI

**AUTORES:**

JESSICA FERNANDA TOSCANO VELASCO

DIANA MARITZA YUCAILLA SISA

**DIRECTOR:**

Dr. SEGUNDO BENEDICTO VALLE RAMÍREZ, PhD.

PUYO-ECUADOR

**2018**

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por la vida, la fortaleza y todas las bendiciones que nos ha dado. Para poder cumplir con nuestros objetivos que nos hemos trazado en nuestras vidas.

Agradecemos a nuestras madres por guiarnos siempre por el camino del bien por siempre ser nuestra motivación y apoyo, ya que gracias a ellas nuestras metas se están realizando.

Agradecemos al Dr. Segundo Valle por el tiempo dedicado, en brindarnos su apoyo incondicional y conocimientos al momento de realizar la investigación, por esas observaciones y sugerencias que formaron parte fundamental para concluir el proyecto de investigación.

En general, agradecemos a quienes de alguna manera contribuyeron con información para alcanzar los objetivos trazados, fomentando y brindando conocimiento a las siguientes generaciones.

## DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo, dedicación y empeño plasmado en este proyecto, está dedicado a mi madre, hermanas, familia y todas las personas que han influido en mi carrera.

En especial dedico mi trabajo a mi amada madre Teresa Velasco por su sacrificio y esfuerzo, porque siempre fue mi motivación y apoyo, por su inquebrantable fe, por siempre mantenerse constante y sobre todo cuando más la necesite a lo largo de mi vida y carrera.

A mis hermanas Maritza Toscano e Inés Toscano quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpla con mis ideales.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, y a todas aquellas personas que durante estos cinco años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Jessica Toscano Velasco

## DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo, dedicación y empeño plasmado en este proyecto, está dedicado a mi madre, familia y todas las personas que han influenciado en mi carrera.

En especial dedico mi trabajo a mi amada madre Juana Sisa por su sacrificio y esfuerzo, porque siempre fue mi motivación y apoyo incondicional, por su inquebrantable fé, por siempre mantenerse constante y sobre todo cuando más la necesite a lo largo de mi vida y carrera.

A mis tías, Anita, Carmen y Julia quienes siempre estaban conmigo en el transcurso de mi formación profesional, en las buenas y las malas, dándome consejos o una palabra de aliento que me sirvió para tener dedicación y fuerza en lo que realizaba durante estos cinco años.

Diana Yucailla Sisa

## RESUMEN

Las plagas han sido la principal causa de pérdidas económicas significativas, en el cultivo de caña de azúcar cuya distribución e importancia varía en las diversas regiones geográficas en que se cultiva esta poácea. El salivazo *Mahanarva andigena* Jacobi, es una de las principales plagas perjudiciales de la caña de azúcar en varios países en América del Sur y el Caribe. En el Ecuador se reportan varios enemigos naturales que ejercen un buen control del salivazo, entre estos se encuentran los hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Verticillium*. En el presente trabajo se realizó la caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. de suelos de cultivo de caña de azúcar de la parroquia Tarqui, provincia de Pastaza, por ser la de mayor superficie cultivada de caña de azúcar. La investigación se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, durante un período de tres meses comprendido entre noviembre 2017 a enero 2018, se seleccionaron siete fincas y se obtuvieron once aislamientos nativos del género *Metarhizium*. De los once aislamientos nativos, diez tienen un aspecto similar y el único que presenta características diferentes es el aislamiento T63-02, el tamaño promedio de los conidios, fue de 6 a 17  $\mu\text{m}$  de largo y de 2,5 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho. En las características fisiológicas se midieron el crecimiento radial, la tasa de crecimiento, producción o concentración de conidios y el porcentaje de germinación, alcanzando el aislamiento T63-02 los valores más altos de 57,4 mm, (2,62  $\text{mm.día}^{-1}$ ) y (1,09  $\times 10^8$  conidios. $\text{mL}^{-1}$ ) respectivamente, los cuales fueron significativamente superior al resto de aislamientos. Finalmente, en el porcentaje de germinación de conidios el aislamiento T63-08 fue superior a los demás aislamientos con un valor de 94,8%. La investigación realizada aporta resultados positivos ya que al caracterizar los aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en suelos con cultivos de caña de azúcar de la Parroquia Tarqui confirma que existe un gran potencial de la especie antes mencionada para en un futuro obtener cepas comerciales para el control biológico.

**Palabras Clave:** Entomopatógenos, *Metarhizium*, aislamientos, conidios.

## ABSTRACT

The pests have been the main cause of significant economic losses, in the cultivation of sugarcane whose distribution and importance varies in the different geographical regions in which this poaceae is cultivated. The spittlebug *Mahanarva andigena* Jacobi, is one of the main harmful pests of sugar cane in several countries in South America and the Caribbean. In Ecuador several natural enemies are reported that exert a good spittlebug control, among these are the entomopathogenic fungi *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* and *Verticillium*. In the present work, the morphological and physiological characterization of entomopathogenic fungi native to *Metarhizium* spp. of sugarcane cultivation soils of the Tarqui parish, province of Pastaza, for being the largest area cultivated with sugarcane. The research was developed in the microbiology laboratory of the Universidad Estatal Amazónica, during a period of three months from November 2017 to January 2018, seven farms were selected and eleven native isolates of the genus *Metarhizium* were obtained. Of the eleven native isolates ten have a similar appearance and the only one that presents different characteristics is the T-63 (02) isolation, the size of the conidia, varied from 6 to 17  $\mu\text{m}$  in length and from 2.5 to 6  $\mu\text{m}$  in width what confirms its elongated shape.

In the physiological characteristics, the radial growth, the rate of growth, production or concentration of conidia and the percentage of germination were measured, reaching the isolation T-63 (02) the highest values of 57.4 mm, (2.62 mm) .day<sup>-1</sup>) and (1.09 x10<sup>8</sup> conidia.mL<sup>-1</sup>) respectively, which were significantly higher than the rest of the isolates. Finally, in the percentage of germination of conidia the T-63 (08) isolation was superior to the other isolates with a value of 94.8%. The research carried out provides positive results since in characterizing the native isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* spp. in soils with sugarcane crops of the Tarqui Parish confirms that there is a great potential of the aforementioned species to obtain commercial strains for biological control in the future.

**Keywords:** Entomopathogens, *Metarhizium*, isolations, conidia.

# ÍNDICE

Agradecimientos .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Resumen .....	v
Abstract .....	vi
1. CAPÍTULO I .....	1
1.1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.2. Problema de Investigación .....	1
1.3. Formulación del Problema .....	3
1.4. Hipótesis de la Investigación .....	3
1.5. Objetivos .....	4
1.5.1. Objetivo General .....	4
1.5.2. Objetivos Específicos .....	4
2. CAPÍTULO II .....	5
2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
2.1.1. Cultivo de Caña Azúcar .....	5
2.1.1.1 Clasificación Taxonomía de la Caña de Azúcar .....	5
2.1.1.2. Principales plagas en el cultivo de caña de azúcar .....	5
2.1.1.3 Salivazo .....	6
2.1.2. Control Químico de Plagas .....	6
2.1.2.1. Efecto de los Plaguicidas en el Ambiente .....	6
2.1.2.2. Control Biológico .....	7
2.1.3. Hongos entomopatógenos .....	7

2.1.3.1. Características Generales de los Hongos Entomopatógenos.....	7
2.1.3.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	8
2.1.3.3. Clasificación Taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	9
2.1.3.4. Características y condiciones de crecimiento <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	9
2.1.3.5. Mecanismos de Infección de Hongos Entomopatógenos sobre insectos plagas.....	9
2.1.3.6. Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos .....	10
2.1.3.7. Características macroscópicas de <i>Metarhizium spp.</i> .....	10
3. CAPÍTULO III.....	12
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1.1. Localización .....	12
3.1.2. Tipo de Investigación.....	13
3.1.3. Métodos de Investigación .....	13
3.1.3.1. Obtención de aislamientos a partir de muestras de suelos .....	13
3.1.3.1.1. Preparación de diluciones para el aislamiento de <i>Metarhizium spp.</i> .....	14
3.1.3.1.2 Inoculación de disoluciones en medio de cultivo .....	14
3.1.3.2. Identificación de aislamientos del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium spp.</i> .....	14
3.1.3.3 Caracterización morfológica del hongo <i>Metarhizium spp.</i> .....	15
3.1.3.3.1. Caracterización macroscópica.....	15
3.1.3.3.2. Caracterización microscópica .....	15
3.1.3.4. Caracterización fisiológica del hongo <i>Metarhizium spp.</i> .....	16
3.1.3.4.1. Crecimiento radial y tasa de crecimiento .....	16
3.1.3.4.2. Producción de conidios.....	16
3.1.3.4.3. Germinación de conidios.....	17
3.1.3.5. Diseño de la Investigación .....	17
3.1.3.5.1. Diseño experimental.....	17
3.1.3.5.2. Análisis estadístico .....	17
4. CAPITULO IV. ....	19

4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
4.1.1. Obtención de aislamientos del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium</i> spp.....	19
4.1.2. Identificación de aislamientos del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium</i> spp. ....	20
4.1.3. Caracterización morfológica del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium</i> spp.....	20
4.1.3.1. Caracterización macroscópica de los aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp.....	20
4.1.3.2. Características microscópicas aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. ....	24
4.1.3.3. Caracterización del tamaño de los conidios de los aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp.....	27
4.1.4. Caracterización fisiológica del hongo <i>Metarhizium</i> spp.....	27
4.1.4.1. Crecimiento radial y tasa de crecimiento .....	27
4.1.4.2. Producción de conidios.....	29
4.1.4.3 Germinación de conidios .....	31
5. CAPITULO V.....	33
5.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	33
5.1.1. CONCLUSIONES .....	33
5.1.2. RECOMENDACIONES.....	34
6. CAPITULO VI. ....	35
6.1. BIBLIOGRAFÍA .....	35

# 1. CAPÍTULO I.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Las plagas han sido la principal causa de las pérdidas en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). A nivel mundial, se reportan alrededor de 1500 especies de insectos plagas que atacan a la caña de azúcar, su distribución e importancia económica varía en las diversas regiones geográficas en que se cultiva esta poácea. En el Ecuador, se han identificado 33 especies de insectos plagas (Mendoza & Garcés, 2013).

El salivazo es una de las principales plagas de la caña de azúcar en varios países de América del Sur y el Caribe. Todas las especies de este insecto plaga tienen en común el hábito de producir una masa espumosa en forma de saliva, lo que le confiere el nombre de “salivazo”. Los registros de esta plaga en el Ecuador datan desde 1968, actualmente se encuentra distribuida en varios sectores del país, especialmente en la zona de Naranjito y Milagro (Guayas), Zaruma (El Oro), Napo (Pastaza) y Nanegalito (Pichincha). Esta especie fue identificada como *Mahanarva andigena* Jacobi y se encuentra presente también en la costa del Pacífico de Colombia (Mendoza *et al.*, 2004).

A nivel local en la Parroquia Tarqui se ha identificado el salivazo (*M. andigena*) el cual constituye una de las principales plagas en la caña de azúcar, que provoca grandes pérdidas en el rendimiento (Valle *et al.*, 2014).

Desde las épocas tempranas del surgimiento y desarrollo del hombre, se tuvo la necesidad de combatir las plagas que afectaban sus cultivos y productos, con el uso de sustancias capaces de eliminarlos, pero el uso continuo de estos plaguicidas contribuye a la crisis de la agricultura que dificulta la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales, y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores urbanos. La búsqueda de la productividad a corto plazo por encima de la sustentabilidad ecológica, practicada en las últimas décadas, ha dejado un saldo a nivel mundial de contaminación y envenenamiento (Rodríguez *et al.*, 2014).

En el Ecuador se puede encontrar a la venta los plaguicidas en almacenes agrícolas o agropecuarios, así como, en tiendas de mascotas, ferreterías y supermercados. El 96% de la superficie agrícola utiliza plaguicida. En el Ecuador, 1'320 988,67 de hectáreas de cultivos,

utilizan algún tipo de plaguicida químico, para el control de plagas lo que representa el 47% (Arias, 2013).

Para el control del salivazo en la caña de azúcar se utilizan los insecticidas carbaryl (Sevin 80 PM), en dosis de 1 a 1.5 kg/ha ó el acefato (Orthene 75 PS), a una dosis de 500 g/ha (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar, 2013).

Según Urra (2015), una de las alternativas para reducir los plaguicidas son el uso de los hongos entomopatógenos. Dentro de este grupo se reportan alrededor de 750 especies de estos hongos, la mayor parte de ellas se encuentran incluidas en los grupos Hypocreales (Ascomycota) y Entomophthorales (Zygomycota).

El ataque de los hongos entomopatógenos se asocia a una gran cantidad de insectos, los cuales son infectados preferentemente en los estadios inmaduros (ninfa o larva). La especificidad con la que atacan a los insectos plaga es bastante variable, ya que algunos tienen un amplio rango de hospederos, mientras que otros están restringidos a una especie de insecto. Entre los principales géneros de hongos entomopatógenos que se utilizan en la agricultura se encuentra *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Rodríguez, 2017).

El CINCAE (2013), reporta que el Ecuador se han observado varios enemigos naturales que realizan un control eficiente del salivazo. Entre los hongos más importantes se encuentran los géneros *Batkoa*, *Entomophthora* y *Metarhizium*, que atacan adultos y ninfas. Además, señala que el uso de *Metarhizium anisopliae* (Metschn) Sorokin es una buena alternativa biológica para ser utilizada en infestaciones bajas o moderadas, especialmente durante la época lluviosa, que propicia condiciones favorables para el desarrollo del hongo.

Las características de *M. anisopliae* está influenciada por la temperatura que determinan otras características de este hongo, como la producción y viabilidad de conidias, inicio de germinación, crecimiento de hifas, entre otras. Temperaturas por encima de 28 °C favorece su desarrollo y promueven una mayor producción de conidias (Ardila, 2013).

## **1.2. Problema de Investigación**

No se han identificado y caracterizado aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en suelos de cultivos de caña de azúcar de la Parroquia Tarqui, para su uso como agentes de control biológico de plagas de importancia económica de este cultivo.

## **1.3. Formulación del Problema**

El uso excesivo de plaguicidas provoca efectos negativos en el suelo, el agua y el ambiente. Además, ha contribuido a aumentar los problemas de plagas debido al desarrollo de resistencia y a la destrucción de los enemigos naturales. Para reducir estos efectos se procura la implementación de control biológico con el hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. el cual ha sido ampliamente utilizado en otros países por su amplio espectro de acción, es por ello que existe la necesidad de obtener aislamientos de este hongo, caracterizarlos morfológica y fisiológicamente, para disponer de una colección de aislamientos provenientes de suelos de cultivo de caña de azúcar de la parroquia Tarqui, para en un futuro utilizarse en el control biológico de plagas de importancia económica, ya que no han sido muestreadas en el sector antes mencionado y existen posibilidades muy altas de obtener aislamientos que pudieran tener ventajas que permitan su uso comercial y ambiental.

## **1.4. Hipótesis de la Investigación**

Existe presencia de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. que sean enemigos naturales del salivazo *M. andigena*, del cultivo de caña de azúcar, que no han sido identificados y caracterizados en los suelos de este cultivo en la Parroquia Tarqui.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo General**

- Caracterizar los aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en suelos con cultivos de caña de azúcar de la Parroquia Tarqui.

### **1.5.2. Objetivos Específicos**

- Aislar e identificar los aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en suelos con cultivo de caña de azúcar.
- Caracterizar morfológica y fisiológicamente los diferentes aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. procedentes de suelos con cultivo de caña de azúcar.

## 2. CAPÍTULO II.

### 2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1.1. Cultivo de Caña Azúcar

El cultivo de la Caña de Azúcar en América se desarrolló especialmente en las zonas cálidas, clima que le era favorable y su cosecha se hacía con mano de obra negra. Tiene un período vegetativo de aproximadamente año y medio, para iniciar su proceso de convertirse en panela (Gualotuña, 2013).

##### 2.1.1.1 Clasificación Taxonomía de la Caña de Azúcar

Según Calle (2013), la caña de azúcar se clasifica en:

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Commelinidae</i>
Orden:	<i>Poales</i>
Familia:	<i>Poaceae</i>
Subfamilia:	<i>Panicoideae</i>
Tribu:	<i>Andropogoneae</i>
Género:	<i>Saccharum</i>
Especies:	<i>Officinarum, barber y sinense (domesticadas Sp.ontaneum y robustum (silvestres), edule,)</i>
Nombre Científico:	<i>Saccharum officinarum</i> L.

##### 2.1.1.2. Principales plagas en el cultivo de caña de azúcar

El salivazo, *M. andigena* (Homóptera, Cercopidae) es una plaga importante de la caña de azúcar en varias regiones del país, particularmente en la Cuenca Baja del Guayas (Naranjito, Milagro, Bucay), Zaruma, Piñas (El Oro), Puyo (Pastaza) y Nanegalito (Pichincha). Se considera una especie nativa de pastos y malezas gramíneas que se ha adaptado eficientemente a la caña de azúcar (CINCAE, 2013).

### **2.1.1.3 Salivazo**

Cruz & Cajilama (2012), destacan al salivazo como la principal plaga de la caña de azúcar en Pastaza, y que el desarrollo de este insecto se ve favorecido por la alta humedad relativa que caracteriza a la provincia, y provoca grandes pérdidas económicas a los productores de caña. El daño es causado por la fase adulta del insecto que para alimentarse perfora y succiona las partes verdes del “cogollo”, lo que seca las hojas. Es la típica intoxicación sistemática llamada “quema de las hojas” que reduce el crecimiento de la planta y en casos extremos la seca por completo.

### **2.1.2. Control Químico de Plagas**

Según Rodríguez (2016), para evitar el daño por plagas en los cultivos de caña de azúcar se recomiendan dosis mínimas efectivas de los insecticidas químicos endosulfán, fipronil, etiprole, imidacloprid, bifentrina, y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (dosis de 500 g/10 litros de agua, a una concentración de  $2 \times 10^{12}$ ) y *M. anisopliae* (dosis de 200 g/10 litros de agua, a una concentración de  $2 \times 10^{12}$ ).

#### **2.1.2.1. Efecto de los Plaguicidas en el Ambiente**

Según (Uribe & Felizzola, 2014), los plaguicidas pueden aumentar la resistencia a las plagas y matar a los enemigos naturales de las plagas. Algunos plaguicidas contribuyen al calentamiento global y a la disminución de la capa de ozono. Además los restos de estos plaguicidas se dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para los sistemas biótico (animales y plantas principalmente) y abiótico (suelo, aire y agua), amenazando su estabilidad y representando un peligro de salud pública (Puerto *et al.*, 2014).

Los ecosistemas naturales son complejos y están relacionados entre sí, por lo que cualquier daño que se produzca en algunos de los organismos de un ecosistema va a tener repercusiones en toda la cadena ecológica. Esto refleja la interconexión y como opera la cadena ecológica, demostrando los posibles y complejos efectos de los plaguicidas en el medio ambiente (Martínez, 2010).

### **2.1.2.2. Control Biológico**

El control biológico es un método de regulación de poblaciones de seres vivos mediante la intervención de otros organismos, que se está aplicando en muchos ámbitos como alternativa a otros métodos de control (Díaz, 2014). Por otro lado, según Merchán (2015), los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial en el control biológico de la población de plagas de insectos ya que son una fuente prometedora de insecticidas y alternativa notable frente a los pesticidas químicos. Estos hongos poseen un mecanismo único de parálisis de insectos. Los enemigos naturales de los insectos que atacan la cutícula del hospedero a través de una combinación de presión mecánica y con enzimas que degradan la cutícula.

### **2.1.3. Hongos entomopatógenos**

Existen alrededor de 400 especies de hongos reportados atacando insectos de importancia médica y agrícola. La idea de usar hongos entomopatógenos surgió en 1874, pero no fue sino hasta finales del siglo pasado, cuando creció la importancia por este tema debido al efecto de resistencia creado por los insecticidas en los insectos de importancia agrícola (García, 2008).

#### **2.1.3.1. Características Generales de los Hongos Entomopatógenos**

Según (Valencia, 2015), las características de los hongos entomopatógenos y su potencial en el control de insectos plaga han dado lugar a una disciplina que ha desarrollado un gran número de estudios encaminados a seleccionar los aislamientos más patogénicos para el control de insectos plaga de diferentes órdenes en diversos cultivos alrededor del mundo, en la actualidad, se han utilizado entre 12 a 15 especies de hongos entomopatógenos para el desarrollo de aproximadamente 170 productos sin embargo, el número de especies de hongos que afectan insectos es sin duda superior parasitando individuos en todos los órdenes de insectos. Mientras que algunos patógenos presentan rangos de hospederos muy amplios, la mayoría prefieren ciertas especies de insectos, también difieren en cuanto a su patogenicidad selectiva de acuerdo a las diferentes etapas de desarrollo del insecto huésped (Nava *et al.*, 2012). Según Gómez *et al.* (2014), 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. Los hongos entomopatógenos más importantes utilizados en el control de insectos plaga, son *B. bassiana*,

*Lecanicillium lecanii* (Zimm.), *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown y Smith e *Hirsutella thompsonii* (Fisher). Estos hongos pertenecen a la clase Deuteromycete, orden Moniliales, familia Moniliaceae, las cuales afectan a una serie de insectos plaga de diferentes órdenes que causan daños en cultivos de importancia económica. Las dos especies más frecuentes de hongos entomopatógenos son *B. bassiana* y *M. anisopliae*, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, por lo cual estos pueden servir de agentes entomopatógenos contra organismos patógenos causantes de enfermedades, que causan daño a plantaciones, animales y al propio ser humano (Bastidas *et al.*, 2015).

### **2.1.3.2. *Metarhizium anisopliae***

Este hongo entomopatógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula. Presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino. Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 $\mu$  de longitud x 1.5 a 2.5 ( $\emptyset$ ). Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 $\mu$  de longitud y de 2 a 4 $\mu$  ( $\emptyset$ ). Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3.5 a 9 $\mu$  de longitud x 1.5 a 3.5 $\mu$  ( $\emptyset$ ) (González *et al.*, 2012).

### **2.1.3.3. Clasificación Taxonómica de *M. anisopliae***

Según Hernández (2016), la clasificación taxonómica de *M. anisopliae* es:

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Clavicipitaceae
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Nombre binomial:	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin.

### **2.1.3.4. Características y condiciones de crecimiento *M. anisopliae***

*M. anisopliae* presenta la habilidad de crecer en forma saprófita, facilidad de diseminación de los conidios, capacidad de sobrevivencia en el suelo y reproducción asexual. Requiere temperatura óptima de 25 a 30 °C y humedad relativa del 100%. Los límites térmicos para la germinación de los conidios y de las hifas de *M. anisopliae* se encuentran alrededor de 37 a 40 °C respectivamente. A una humedad por debajo de 53% se reduce la viabilidad de los conidios (Ojeda *et al.*, 2011).

### **2.1.3.5. Mecanismos de Infección de Hongos Entomopatógenos sobre insectos plagas**

Según Carvajal & Troya (2017), los hongos entomopatógenos ingresan al insecto huésped en cuatro fases:

1. Cuando la espora se adhiere a la cutícula externa del insecto. La espora, al entrar en contacto con su integumento, reconoce ciertas sustancias que exuda la epicutícula, produciendo usualmente un mucilago que evita la desecación y la mantiene unida al huésped.

2. Cuando la espora comienza a germinar. Una vez que la espora se ha adherido a la cutícula del insecto, comienza a penetrar a través de estructuras germinativas, entre las cuales se destacan los aprensorios, que son estructuras cubiertas de una sustancia mucilaginosa que les permite crear una interfase entre el tubo germinativo y la epicutícula. Este proceso requiere de condiciones de humedad y temperatura particulares.

3. Cuando la espora penetra vía tubo germinativo. La penetración del tubo germinativo en la epicutícula externa y la procutícula, se produce por la activación de mecanismos enzimáticos y físicos que promueven la digestión de la cutícula, con la ayuda de enzimas como quitinasas, lipasas y proteasas; así, el tubo germinativo penetra la cutícula del insecto e invade el celoma.

4. Cuando el hongo se desarrolla en el interior del insecto (celoma). Al ingresar el hongo en el interior del insecto, debido a su primitivo sistema inmunológico, apenas responde produciendo algunas toxinas que pueden retrasar mas no limitar su desarrollo. Ya en el interior del artrópodo, el hongo comienza por atacar el tejido muscular y adiposo; aquí, las hifas se fragmentan en pequeños cilindros que se transportan por la hemolinfa del insecto. En estas condiciones su número se incrementa, hasta alcanzar todas las estructuras y tejidos del invertebrado, produciendo finalmente su muerte.

#### **2.1.3.6. Caracterización e identificación de hongos entomopatógenos**

Según Schapovaloff (2012), la caracterización de los hongos entomopatógenos, tanto a nivel morfológico, fisiológico y molecular, es considerada una etapa primordial para la selección de especies fúngicas como agentes de control biológico de insectos. La caracterización morfológica consiste en el estudio de las estructuras macroscópicas (el aspecto y color de las colonias y la velocidad de crecimiento en medios artificiales) y microscópicas (la forma y tamaño de las hifas, conidióforos, fiálides y conidios). Especialmente, la forma y tamaño de los conidios son utilizados para la identificación de las especies.

#### **2.1.3.7. Características macroscópicas de *Metarhizium spp.***

La coloración de la colonia va desde el verde oliva hasta el verde oscuro debido a la maduración de los conidios, con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana (García *et al.*,2011).

Al cabo de 15 días el hongo completa su desarrollo y alcanza a esporular completamente, el cual podrá ser utilizado en la producción masiva del mismo (Gómez & Mendoza, 2013).

### 3. CAPÍTULO III.

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1.1. Localización del área de estudio

La investigación se desarrolló en áreas dedicadas a la producción del cultivo de caña de azúcar de la Parroquia Tarqui, donde fueron seleccionadas 7 fincas para el muestreo y en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica.

#### LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

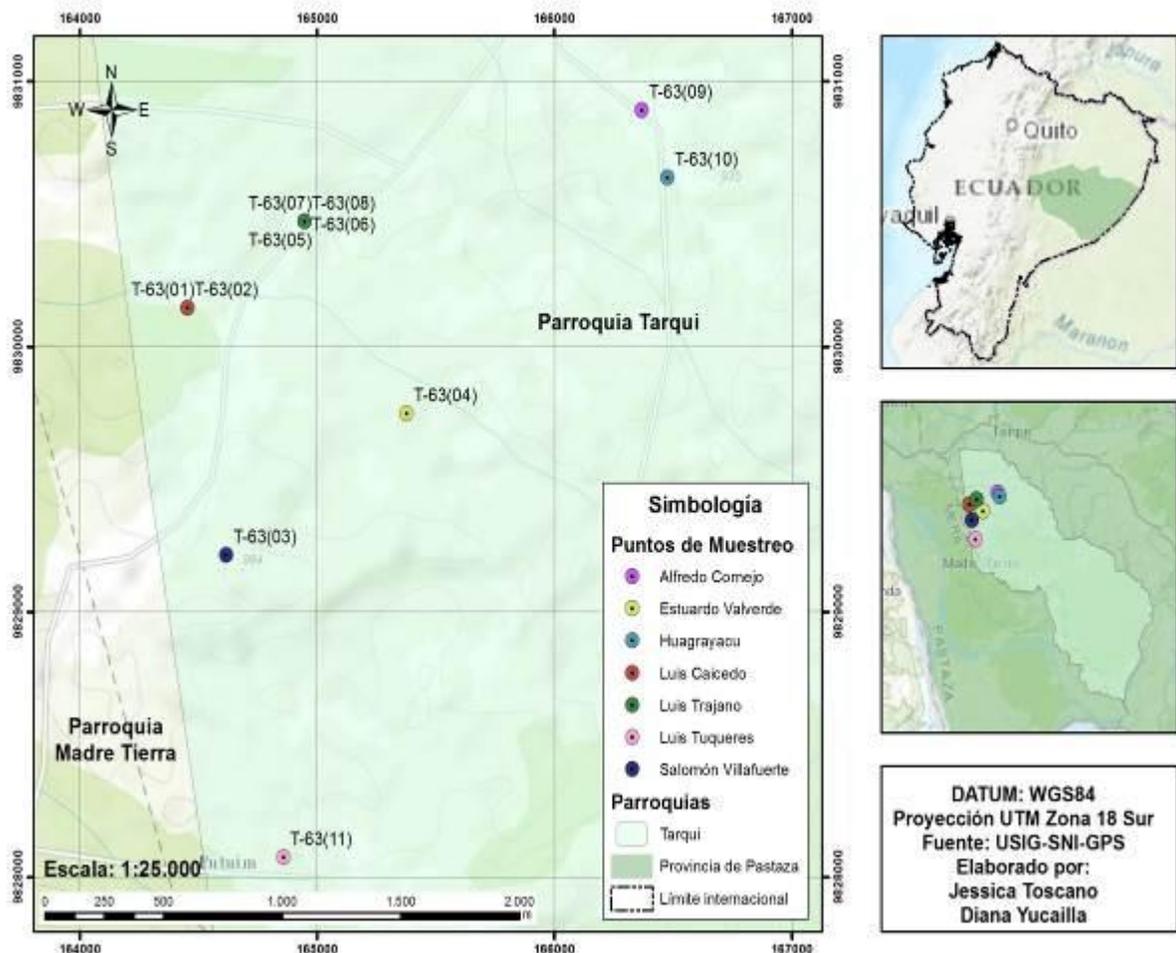


Figura 1. Ubicación Geográfica del Área de Estudio

La parroquia Tarqui comprende un rango altitudinal de 2692 m.s.n.m y una máxima de 3.840 m.s.n.m, su clima es cálido-húmedo y la temperatura oscila entre los 18 y 24 °C (GADPR, 2015).

Los suelos de la provincia de Pastaza poseen una fisiografía ondulada, colinada o quebrada con pendientes variables inferiores al 40% y corresponden al orden Inceptisoles. Se caracterizan por una baja fertilidad, alta acidez y toxicidad causada por el aluminio. Además de una alta saturación de humedad, lo que provoca una gran acumulación de materia orgánica de baja calidad (Valle, 2015).

### **3.1.2. Tipo de Investigación**

El presente estudio se consideró de carácter descriptivo ya que permitió utilizar técnicas para la toma, recepción y procesamiento de los datos, y a partir de esto poder asociar las variables de investigación e identificar características y conductas propias del problema de estudio, y exploratorio porque se dió a conocer las características de *Metarhizium* spp. en los cultivos de caña de azúcar de la parroquia Tarqui. Tomando en referencia al tiempo y a los resultados que se obtuvieron fue un estudio que se desarrolló en tres meses y prospectivo porque los resultados obtenidos se basaron en información levantada en campo y su utilidad será apreciable a futuro una vez relacionadas las partes del proyecto.

### **3.1.3. Métodos de Investigación**

#### **3.1.3.1. Obtención de aislamientos a partir de muestras de suelos**

Se tomaron muestras de suelo de 7 fincas. Para la toma de muestras de suelo se utilizó la metodología de Schapovaloff (2012), con modificaciones para que se ajusten a las condiciones de la zona. Se inició con un recorrido en cada finca para delimitar el área (1 ha) a ser muestreada. Posteriormente, se procedió a limpiar la superficie del sitio. Con la ayuda de una pala se realizó un hoyo en forma de “V” hasta 20 cm de profundidad, se tomó una tajada de 2-3 cm de espesor. Con un machete se eliminaron los bordes y seleccionaron la parte central de la tajada y se colocó en un balde de 20 L para su homogenización y obtención de una submuestra por sitio. En cada finca se recolectaron cuatro submuestras, la cuales se tomaron haciendo un recorrido en zigzag, con el fin de abarcar al máximo la variabilidad espacial de la finca. Seguidamente las cuatro submuestras se depositaron en un balde de 20 L, retirando

todas las raíces, se homogenizó y se tomó un kilogramo de suelo (muestra compuesta), y se colocó en una funda plástica hermética. Posteriormente, fueron trasladadas al laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal Amazónica con su respectiva identificación (propietario, provincia, parroquia, fecha de muestreo) y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización con una temperatura de  $17\pm 1$  °C.

#### **3.1.3.1.1. Preparación de diluciones para el aislamiento de *Metarhizium spp.***

Para la obtención de los aislamientos se empleó la metodología de aislamientos monospóricos por dilución seriada de Mondino (2012), con algunas modificaciones: se mezclaron las cuatro submuestras en un balde plástico transparente de 20 L para su homogenización y se tomó aproximadamente 250 g, de los cuales se pesó en una balanza de precisión 10 g de muestra sobre papel aluminio. Seguidamente se colocó en un erlenmeyer que contenía 90 mL de agua destilada estéril y se homogenizó por 10 minutos en el agitador magnético y posteriormente se realizaron diluciones seriada en base 10 hasta la dilución  $10^{-2}$ .

#### **3.1.3.1.2 Inoculación de disoluciones en medio de cultivo**

Para la inoculación se utilizó la dilución  $10^{-2}$ , para ello se tomó 100  $\mu$ L de esta dilución con ayuda de una micropipeta y se colocaron en el centro de la caja de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ), que contenía PDA (Potato Dextrosa Agar). Posteriormente se dispersó la solución por toda el área de la caja de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ), con ayuda de una asa de drigalski, seguidamente se selló con parafilm, se rotuló con su respectiva fecha de siembra y lugar de origen de la muestra. Se inocularon en seis cajas de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ) las diluciones de cada finca. Finalmente, las cajas inoculadas se trasladaron a la incubadora (Marca Mermemt) a una temperatura de  $27\pm 1$  °C. Diariamente se observaron las cajas de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ) hasta verificar la presencia de colonias del hongo de interés *Metarhizium spp.* Una vez observado y verificado el crecimiento de colonias del hongo de interés, se realizó el repique en nuevas cajas de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ), por dos ocasiones consecutivas hasta obtener colonias puras (Mondino, 2012).

#### **3.1.3.2. Identificación de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium spp.***

Los aislamientos se identificaron sobre la base de las estructuras reproductivas, según Barnett & Hunter (1998) y Humber (2012).

### **3.1.3.3 Caracterización morfológica del hongo *Metarhizium* spp.**

#### **3.1.3.3.1. Caracterización macroscópica**

Se utilizó la metodología de Obando *et al.* (2013), con algunas modificaciones. Para ello de una colonia pura esporulada, se preparó una suspensión de conidios que contenía una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios.mL<sup>-1</sup> y se inoculó 100 µL en una caja de Petri de 90 mm (∅) que contenía PDA. Posteriormente se llevó a incubación a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C, durante cuatro días, hasta que esté totalmente llena de micelio la placa. De estas colonias se tomaron discos de 5mm (∅) con ayuda de un sacabocados y se colocaron en el centro de cada caja de Petri de 90 mm (∅) con PDA y se dejaron en incubación por 20 días. Cada 48 horas se observó el color de las colonias, aspecto, superficie, forma, elevación y crecimiento. El ensayo se organizó bajo un diseño completamente aleatorio, con seis repeticiones por aislamiento.

#### **3.1.3.3.2. Caracterización microscópica**

Para la caracterización microscópica, de las estructuras del hongo se realizó según la técnica del microcultivo utilizada por Valle (2015), para ello se colocó papel de filtro en el interior de cada caja de Petri de 90 mm (∅) y sobre él se pusieron dos portaobjetos colocados en cruz. Se esterilizaron y posteriormente se adicionó agar agua al 1,5% sobre el portaobjeto de la parte superior, en el cual se sembró una porción de una colonia de cada aislamiento, con ayuda de un asa recta. Seguidamente, se humedeció el papel de filtro con agua destilada estéril, se sellaron con parafilm y se llevaron las placas a incubación a  $27 \pm 1$  °C. A partir del tercer día y hasta los cinco días se realizaron las observaciones al microscopio con aumento de 40X para verificar la esporulación.

La toma de microfotografías de la morfología, disposición de los conidios y la medición de 100 conidios (largo y ancho) por cada aislamiento se realizó con ayuda de la cámara digital (CMEX-3 Cámara digital con sensor CMOS de 3 Mp. DC.3000c) incorporada al microscopio (Euromex), con aumento de 100X.

### 3.1.3.4. Caracterización fisiológica del hongo *Metarhizium* spp.

#### 3.1.3.4.1. Crecimiento radial y tasa de crecimiento

Para determinar el crecimiento radial y tasa de crecimiento de los aislamientos, con un sacabocados se tomaron discos de 5mm ( $\emptyset$ ) de colonias de cuatro días de crecimiento de cada aislamiento, los discos de micelio se transfirieron usando un asa estéril y se colocaron en el centro de cada caja de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ), previamente trazada en la parte externa de la base con una línea en dirección horizontal y vertical. Posteriormente, se sellaron con parafilm, se rotularon y se llevaron a incubación por 20 días a  $27\pm 1$  °C en total oscuridad. El crecimiento radial de las colonias se midió en dos direcciones perpendiculares cada 48 horas usando un calibrador Vernier digital por un total de 20 días. A los valores obtenidos en la medición se les restaron los 5 mm correspondientes a cada círculo de micelio inicial. La tasa de crecimiento se calculó al final del ensayo con la siguiente formula: Tasa de Crecimiento= (Crecimiento final- Crecimiento inicial)/tiempo de incubación, de acuerdo a Kalm & Kalyoncu (2008) y Guijón *et al.* (2010). El ensayo se organizó bajo un diseño completamente aleatorio, con seis repeticiones por aislamiento.

#### 3.1.3.4.2. Producción de conidios

Para determinar la concentración de conidios por cada aislamiento se siguió la metodología de Ruiz *et al.* (2011), para ello de las cajas de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ) de veinte días de incubación se procedió a cosechar los conidios de la superficie del cultivo bajo condiciones asépticas inundando la caja de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ) con 10 mL de agua destilada estéril (ADE) + Tween 80 (0,1%) y raspando la colonia con un bisturí. La suspensión de conidios fue filtrada con gasa estéril para separar el micelio. Los conidios se agitaron durante 10 min en un Vórtex. Posteriormente el conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer improved brigh-line, utilizando la dilución  $10^{-2}$ , en cinco cuadrantes del cuadrado central con ayuda del objetivo 40X del microscopio. El experimento se organizó bajo un diseño experimental completamente aleatorio con seis repeticiones por aislamiento. La concentración por  $\text{mL}^{-1}$  se estimó mediante la fórmula:

$$\text{Concentración (Conidios/mL)} = \frac{\text{Total células contadas} \times 250.000}{\text{Número de cuadros} \times \text{Dilución}}$$

### **3.1.3.4.3. Germinación de conidios**

Para evaluar la germinación de conidios, se utilizó la metodología utilizada por Valle (2015). La germinación se evaluó utilizando cajas de Petri de 90 mm ( $\emptyset$ ), en las cuales se marcaron en la superficie externa inferior cinco puntos de 24 mm ( $\emptyset$ ). Luego se vertieron 10 mL de agar - agua al 1,5%. En cada punto se sembró 10  $\mu$ L de la dilución  $10^{-2}$  de cada aislamiento a evaluar. Las cajas se incubaron a  $27\pm 1$  °C durante 24 h y se agregó una gota de azul de lactofenol a cada sitio sembrado con el hongo, para detener su desarrollo. Posteriormente, se cortó esta muestra, se colocó en un porta objetos, se cubrió con un cubre objetos y se observó al microscopio. Se contó mínimo 100 conidias por punto de crecimiento, considerando como conidia germinada aquella cuyo tubo germinativo sobrepasó el doble del diámetro mayor del conidio. Se registró el número de conidias germinadas y no germinadas. Se utilizaron seis réplicas (cinco puntos de inoculación) por cada aislamiento bajo un diseño estadístico completamente aleatorio.

### **3.1.3.5. Diseño de la Investigación**

#### **3.1.3.5.1. Diseño experimental**

**Factores de estudio:** El factor de estudio de esta investigación fue los diferentes aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp.

**Variables de respuesta.** Las variables de respuesta de esta investigación fueron: La descripción macroscópica (color, aspecto, superficie, pigmentación del hongo en el medio de cultivo), descripción microscópica (forma de conidióforos, estructura, tamaño conidios), el crecimiento radial, tasa de crecimiento, producción de conidios y el porcentaje de germinación.

#### **3.1.3.5.2. Análisis estadístico**

Para el análisis del tamaño de conidios de cada uno de los aislamientos se utilizó la estadística descriptiva.

Para el análisis del crecimiento radial, tasa de crecimiento, producción de conidios y germinación, se realizó un análisis de varianza de un solo factor. Para detectar las diferencias estadísticas entre los aislamientos en cada una de las variables respuesta estudiada se aplicó la

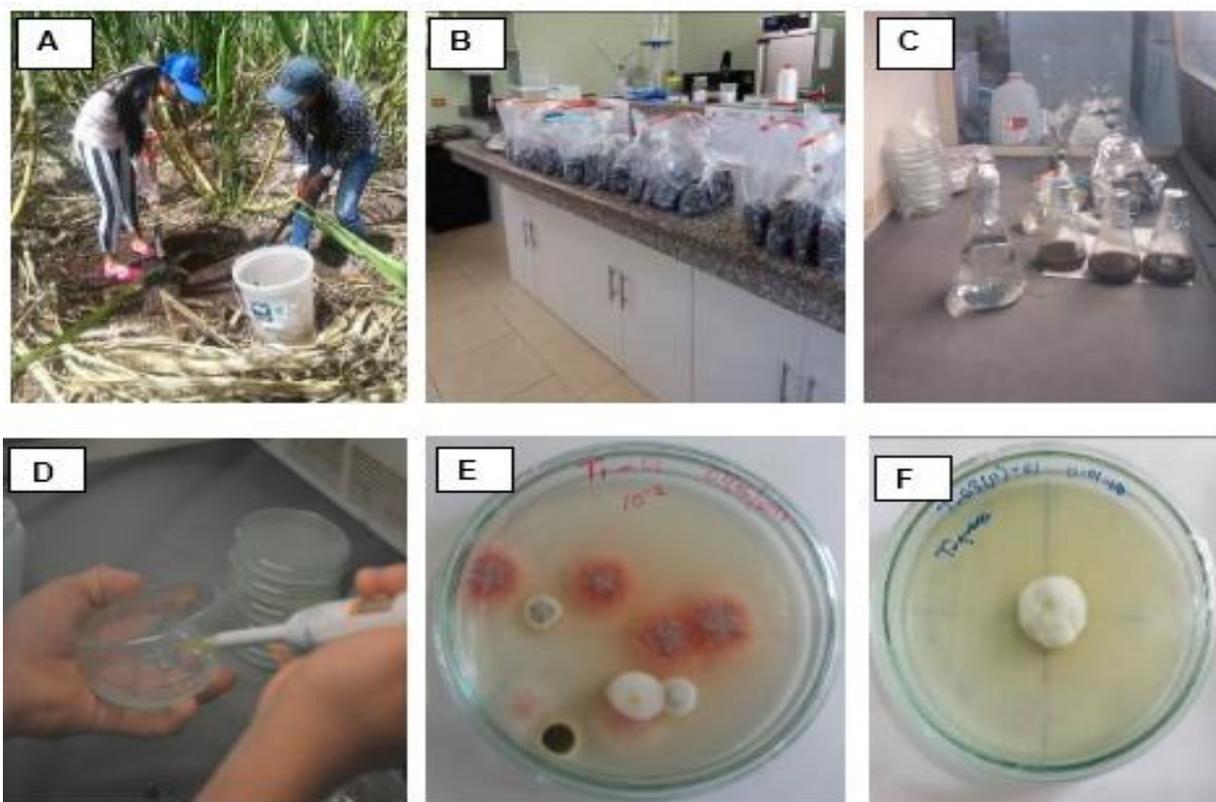
prueba de rangos múltiples de Tukey al 95% de probabilidad. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico infoStat versión 2017.

## 4. CAPITULO IV.

### 4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1.1. Obtención de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp.

Durante las prospecciones realizadas en las siete fincas de la parroquia Tarqui, se obtuvieron once aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp., en suelos de cultivos de caña de azúcar, durante un período de tres meses comprendido entre noviembre 2017 a enero 2018 (Fig. 2).



**Figura 2.** A) Recolección de muestra de suelo en cultivo de caña de azúcar, B) Muestras de suelo en laboratorio, C) Preparación de disoluciones de la muestra de suelo, D) Inoculación de dilución  $10^{-2}$ , E) Selección de colonias de *Metarhizium* spp. para su repique, F) Colonia pura del hongo *Metarhizium* spp. a los 10 días de crecimiento.

Los once aislamientos de *Metarhizium* spp. fueron codificados según el lugar de origen (Tabla 1).

**Tabla 1.** Codificación de los aislamientos nativos de *Metarhizium* spp.

<b>No. Aislamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Origen (Propietario de la finca)</b>	<b>Fecha de colecta muestra de suelo</b>
1	T63-01	Luis Caicedo	6-11-2017
2	T63-02	Luis Caicedo	6-11-2017
3	T63-03	Salomón Villafuerte	6-11-2017
4	T63-04	Esturado Valverde	7-11-2017
5	T63-05	Luis Trajano	7-11-2017
6	T63-06	Luis Trajano	7-11-2017
7	T63-07	Luis Trajano	7-11-2017
8	T63-08	Luis Trajano	7-11-2017
9	T63-09	Alfredo Cornejo	8-11-2017
10	T63-10	Huagrayacu	8-11-2017
11	T63-11	Luis Túqueres	9-11-2017

#### **4.1.2. Identificación de aislamientos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp.**

Se realizó una clasificación morfológica según Humber (2012), que permitió determinar el género de los aislamientos obtenidos. Se encontraron 11 aislamientos que pertenecen al género *Metarhizium*, según el color de las colonias, que son inicialmente blancas y posteriormente se tornan verdes olivas u oscuras cuando ya están esporuladas. Así como, por la forma de los conidios que son ovoides aceptados, agrupados en largas cadenas paralelas.

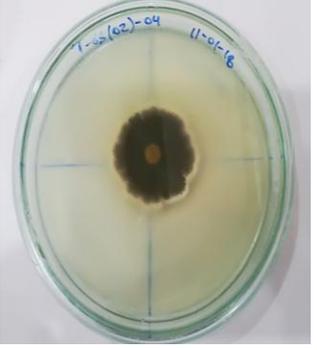
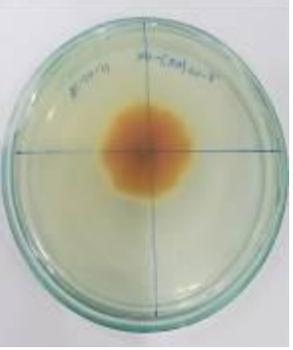
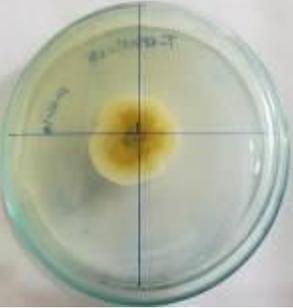
#### **4.1.3. Caracterización morfológica del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp.**

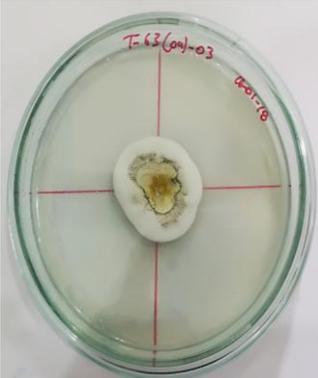
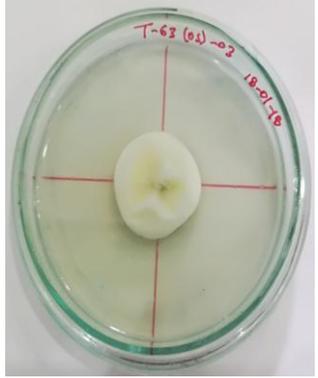
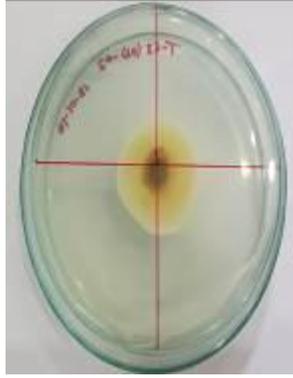
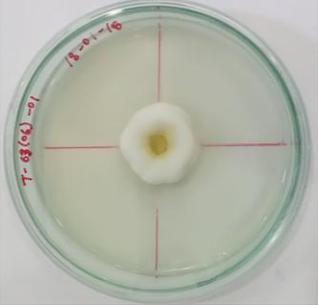
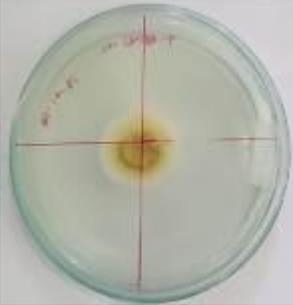
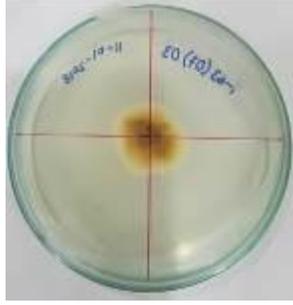
##### **4.1.3.1. Caracterización macroscópica de los aislamientos de *Metarhizium* spp.**

En la tabla 2, se presenta la caracterización macroscópica de cada uno de los aislamientos obtenidos del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp., en donde se evidencia que la mayoría

de aislamientos a los veinte días presentaron un aspecto similar, por lo general colonias algodonosas, blancas, con poca esporulación, micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo, elevación pulvinada, bordes regulares, no difunde pigmento al medio, el reverso es de color amarillo claro y un borde fino de color blanco. El aislamiento T63-02, fue el único que presentó características diferentes, colonias desde el inicio pegado al medio, blanco, que se torna verde oscuro con la esporulación, tiene esporulación abundante, el micelio es blanco fino hacia el borde de la colonia, bordes irregulares, no difunde pigmento al medio, reverso color naranja en el centro y bordes blancos.

**Tabla 2. Características macroscópicas de los aislamientos de *Metarhizium* spp.**

Aislamiento	Anverso	Reverso	Características Macroscópicas
T63-01			Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia. Bordes regulares. Elevación pulvinada. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo con el centro color oscuro y un borde fino de color blanco.
T63-02			Colonias desde el inicio pegado al medio, blanco, que se torna verde oscuro con la esporulación. Esporulación abundante. Micelio blanco fino hacia el borde de la colonia. Bordes irregulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color naranja en el centro y bordes blancos.
T63-03			Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.

<p><b>T63-04</b></p>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<p><b>T63-05</b></p>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<p><b>T63-06</b></p>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<p><b>T63-07</b></p>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>

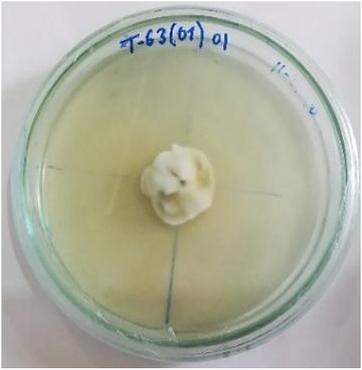
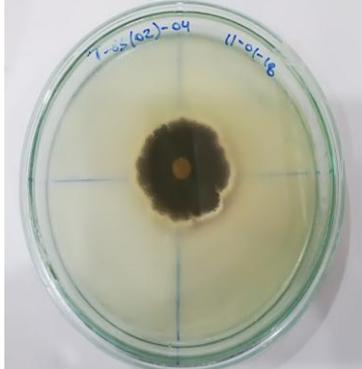
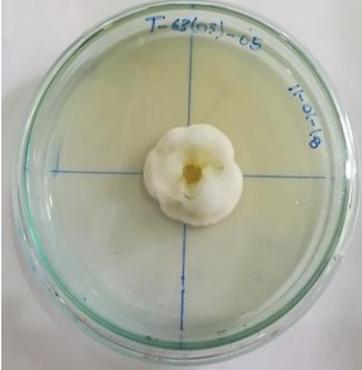
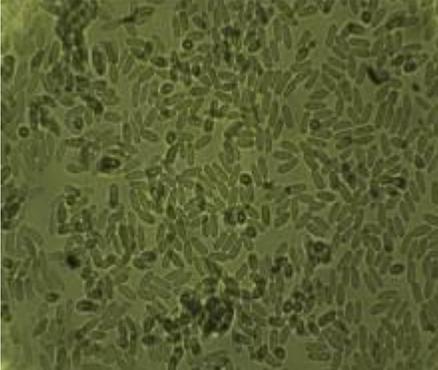
<b>T63-08</b>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<b>T63-09</b>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<b>T63-10</b>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>
<b>T63-11</b>			<p>Colonias al inicio algodonosa, blanca. Poca esporulación. Micelio blanco hacia el borde de la colonia y en el centro color amarillo. Elevación pulvinada. Bordes regulares. No difunde pigmento al medio. Reverso color amarillo naranja en el centro y borde blanco.</p>

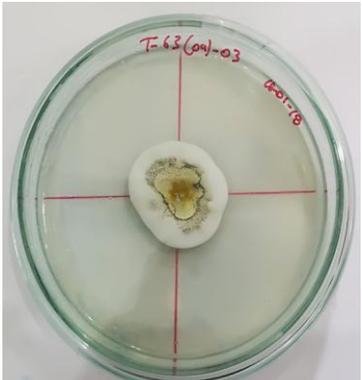
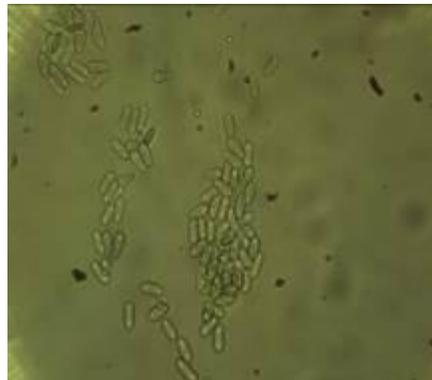
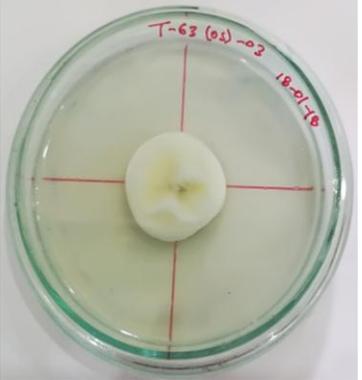
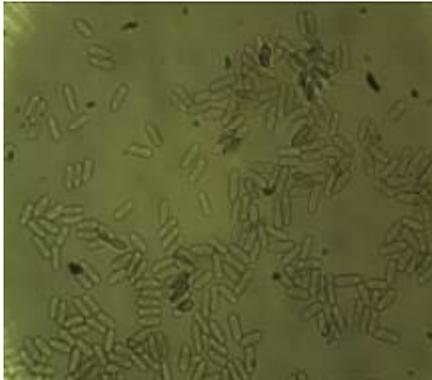
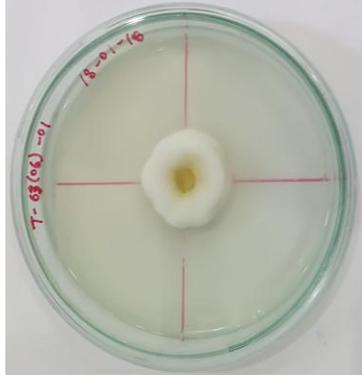
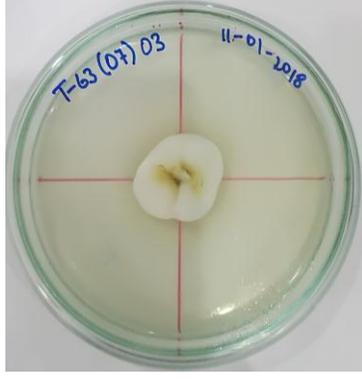
Las características de los aislamientos obtenidos tienen aspectos similares a los resultados reportados por Obando *et al.* (2013) en su estudio. Mientras que, en estudios realizados por García *et al.* (2011), la coloración de la colonia va desde verde oliva hasta el verde oscuro debido a la maduración de los conidios, con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana, semejantes a los observados en el aislamiento T63-02 de nuestro estudio.

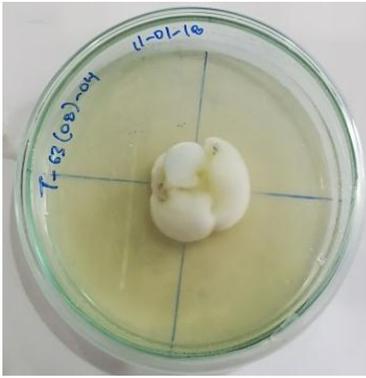
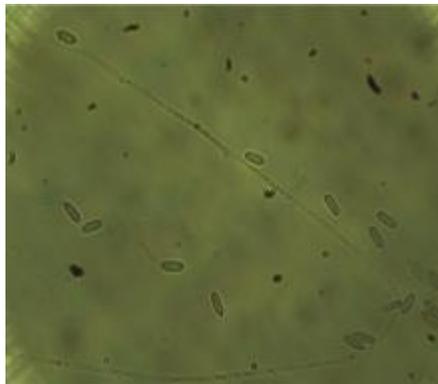
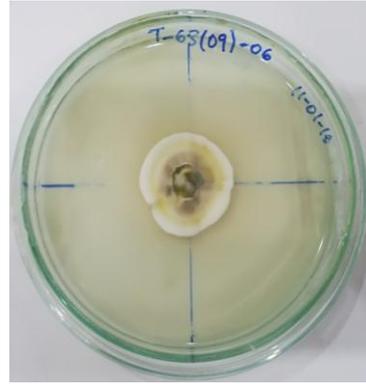
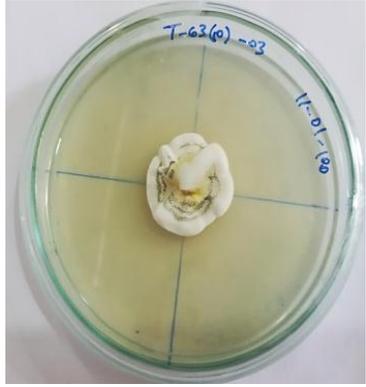
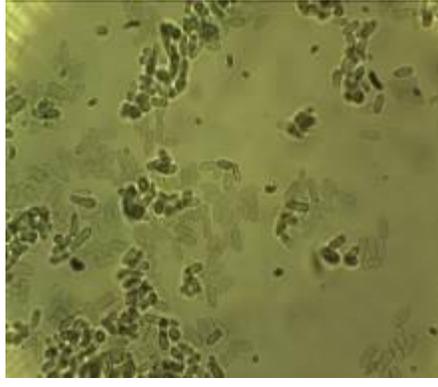
#### 4.1.3.2. Características microscópicas aislamientos de *Metarhizium* spp.

En la tabla 3 se muestra las características microscópicas de los aislamientos de *Metarhizium* spp, con su respectiva descripción de los conidios.

**Tabla 3. Características microscópicas aislamientos de *Metarhizium* spp**

Aislamientos	Morfología de la colonia	Morfología de los conidios	Características microscópicas
T63-01			<p>Conidios de 9-17 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 3-5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
T63-02			<p>Conidios de 8-12 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
T63-03			<p>Conidios de 8-12 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 3-6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>

<p><b>T63-04</b></p>			<p>Conidios de 6-9 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-05</b></p>			<p>Conidios de 7-11 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-06</b></p>			<p>Conidios de 8-13 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-6 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-07</b></p>			<p>Conidios de 7-12 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>

<p><b>T63-08</b></p>			<p>Conidios de 7-11 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 3-4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-09</b></p>			<p>Conidios de 8-11 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 3-4 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-10</b></p>			<p>Conidios de 7-13 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>
<p><b>T63-11</b></p>			<p>Conidios de 6-12 <math>\mu\text{m}</math> de largo y 2-5 <math>\mu\text{m}</math> de ancho cilíndricos y a menudo con un ligero estrechamiento central, formando cadenas muy largas, de color verde en masas.</p>

#### 4.1.3.3. Caracterización del tamaño de los conidios de los aislamientos de *Metarhizium* spp.

En la caracterización del tamaño de los conidios se determinó que el tamaño de los conidios de los aislamientos evaluados, estuvo entre 6 y 17  $\mu\text{m}$  de largo y entre 2,5 y 6  $\mu\text{m}$  de ancho y con una relación largo ancho de 2,4 a 3,3  $\mu\text{m}$ , lo que confirma su forma alargada y ovoide (Tabla 4).

**Tabla 4. Características morfológicas de los conidios producidos por aislamientos de *Metarhizium* spp.**

Aislamiento	Tamaño conidios						Relación Largo/ancho
	Largo ( $\mu\text{m}$ )			Ancho ( $\mu\text{m}$ )			
	Media $\pm$ D. E.	Min.	Máx	Media $\pm$ D. E.	Min.	Máx	
T63-01	12,32 $\pm$ 2,06	9	17	3,76 $\pm$ 0,77	2	5	3,3
T63-02	9,62 $\pm$ 0,97	8	12	3,6 $\pm$ 0,67	2	5	2,7
T63-03	10,22 $\pm$ 1,25	8	15	3,94 $\pm$ 0,77	3	6	2,6
T63-04	7,88 $\pm$ 0,92	6	9	2,98 $\pm$ 0,62	2	4	2,6
T63-05	9,42 $\pm$ 0,99	7	11	3,48 $\pm$ 0,65	2	5	2,7
T63-06	9,82 $\pm$ 1,19	8	13	3,94 $\pm$ 0,82	2	6	2,5
T63-07	9,32 $\pm$ 0,84	7	11	3,18 $\pm$ 0,44	2	4	2,9
T63-08	9,38 $\pm$ 1,32	7	13	3,48 $\pm$ 0,58	2	5	2,7
T63-09	8,68 $\pm$ 1,27	6	12	3,56 $\pm$ 0,67	2	5	2,4
T63-10	9,38 $\pm$ 1,32	7	13	3,48 $\pm$ 0,58	2	5	2,7
T63-11	8,68 $\pm$ 1,27	6	12	3,56 $\pm$ 0,67	2	5	2,4

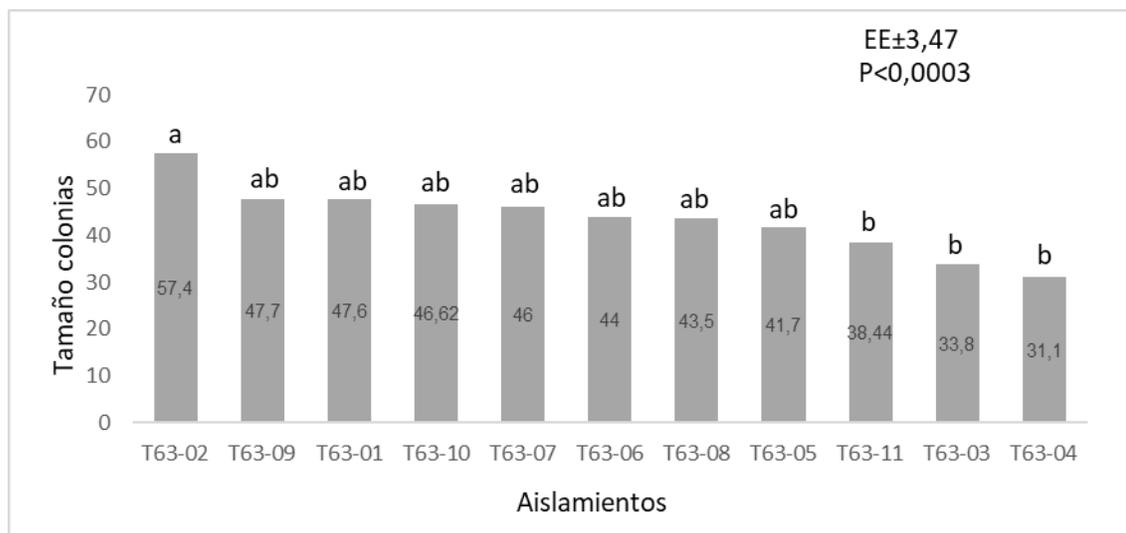
Los conidios son aceptados ovoides, formado cadenas usualmente arregladas en columnas prismáticas o cilíndricas o en masas solidas de cadenas paralelas, similar a lo reportado por Rojas *et al.* (2017). El tamaño promedio de los conidios de los aislamientos evaluados, se encuentran dentro del rango de 7,77 y 10,93  $\mu\text{m}$  de largo y de 3,88 a 7,40  $\mu\text{m}$  de ancho reportados para el género *Metarhizium* por Fernandes *et al.* (2010).

#### 4.1.4. Caracterización fisiológica del hongo *Metarhizium* spp.

##### 4.1.4.1. Crecimiento radial y tasa de crecimiento

En la figura 3 se evidencia el tamaño de los aislamientos, donde obtuvo un mayor tamaño el aislamiento T63-02, con un valor de 57,4 mm, el cual fue significativamente superior a los

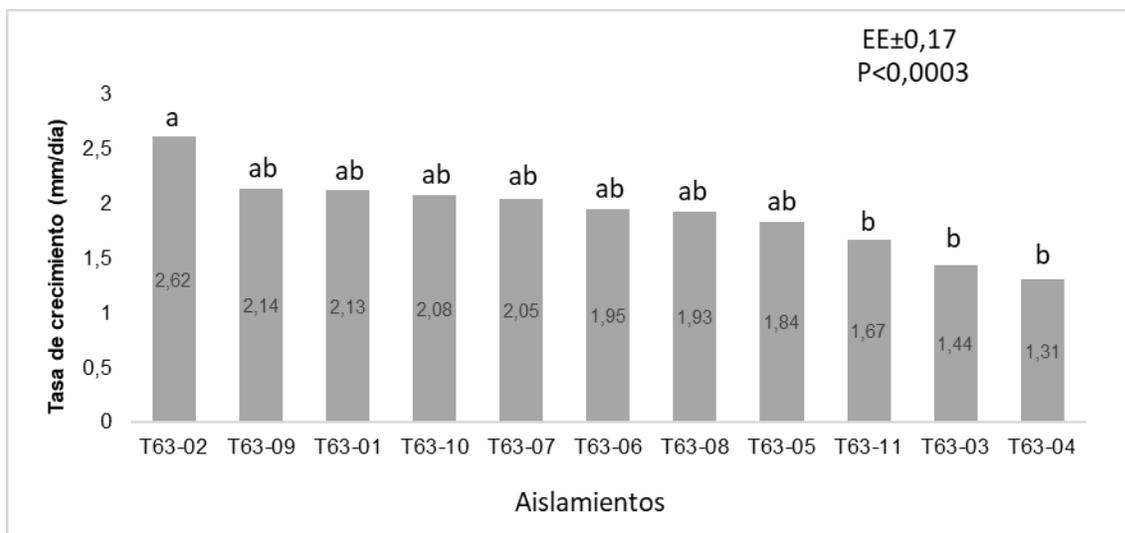
aislamientos T63-11, T63-03 y T63-04, que alcanzaron valores de 38,44; 33,8 y 31,1 respectivamente a los veinte días de crecimiento.



**Figura 3. Crecimiento micelial de los aislamientos de *Metarhizium* spp. a los 20 días de desarrollo en PDA a  $27\pm 1$  °C /Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n=6$ ).**

En el presente estudio se verificó que el tamaño de las colonias de los aislamientos nativos fue superior al tamaño de colonias de 32 y 50 mm que alcanzaron diferentes aislamientos de *M. anisopliae* durante 21 días, sobre Papa Dextrosa Agar, en un estudio realizado por Skalický *et al.* (2013). Por otro lado, en un estudio realizado por Pik *et al.* (2009) obtuvieron un crecimiento radial de 61,7 y 61,9 mm, a los 14 días, sobre Papa Dextrosa Agar y Saboraud Dextrosa Agar + 1% de Extracto de levadura, crecimiento muy superior a los observados en los aislamientos nativos evaluados.

El análisis de varianza para la tasa de crecimiento a  $27\pm 1$  °C durante 20 días, mostró diferencias entre los aislamientos durante el período de crecimiento total ( $p < 0,0003$ ). El aislamiento T63-02, mostró el valor más alto de crecimiento ( $2,62 \text{ mm.día}^{-1}$ ) y fue significativamente superior a los aislamientos T63-11, T63-03 y T63-04, que alcanzaron tasas de crecimiento de  $1,67$ ;  $1,44$  y  $1,31 \text{ mm.día}^{-1}$ , respectivamente. El resto de aislamientos mostraron valores de tasas de crecimiento de  $2,14$  y  $1,35 \text{ mm.día}^{-1}$ , sin diferencias estadísticas entre ellos.



**Figura 4. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *Metarhizium* spp. sobre PDA a los 20 días de desarrollo a  $27\pm 1$  °C / Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n=6$ ).**

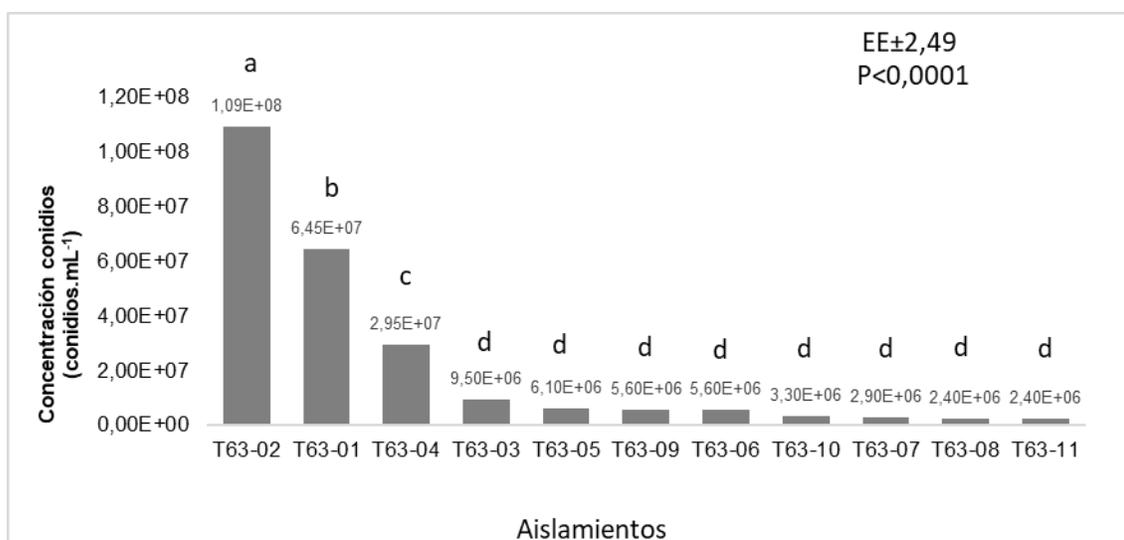
La tasa de crecimiento obtenida en el presente estudio es inferior a la tasa promedio de crecimiento de 2,30 y 3,22 mm.día<sup>-1</sup> obtenida al evaluar el crecimiento de seis aislamientos de *M. anisopliae* por Dimbi *et al.* (2004).

En otro estudio, al evaluar el crecimiento de tres aislamientos de *M. anisopliae* sobre Papa Dextrosa Agar y Saboraud Dextrosa Agar, con adición del 1% de extracto de levadura obtuvieron una tasa de crecimiento entre 5,35 y 6,54 mm.día<sup>-1</sup> Pik *et al.* (2009), superior a la tasa de crecimiento obtenida en el aislamiento nativo T63-02.

En el presente estudio la tasa de crecimiento de 2,62 mm.día<sup>-1</sup> obtenido en el aislamiento nativo T63-02, es superior a lo determinado por García *et al.* (2012), quienes encontraron tasas de crecimiento, de 1,5 y 1,8 mm.día<sup>-1</sup>, al evaluar diferentes aislamientos de *M. anisopliae*. No obstante, los valores obtenidos son inferiores a la tasa de 3,1 y 3,7 mm.día<sup>-1</sup> observada por Ruiz *et al.* (2011), en cinco cepas de *M. anisopliae*, sobre este medio de cultivo. De igual forma a los reportados por Rachappa *et al.* (2007) quienes observaron valores de crecimiento micelial de 38 a 39 mm/día en aislamientos de *M. anisopliae*.

#### 4.1.4.2. Producción de conidios

El análisis de varianza para la concentración de conidios por placa de Petri de 90 mm Ø a los 20 días de incubación a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C, mostró diferencias entre los aislamientos ( $p < 0,0001$ ). El aislamiento T63-02, mostró el valor más alto de producción de conidios por placa Petri ( $1,09 \times 10^8$  conidios.mL<sup>-1</sup>) y fue significativamente superior a los demás aislamientos. Los aislamientos T63-01 y T63-04, mostraron una producción intermedia con valores de  $6,45 \times 10^7$  y  $2,95 \times 10^7$  conidios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, con diferencias significativas entre ellos. Los aislamientos con la menor producción de conidios presentaron valores entre  $9,50$  y  $2,4 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>, sin diferencias estadísticas entre ellos (Figura 5).



**Figura 5. Concentración de conidios por cada aislamiento de *Metarhizium* spp. sobre PDA a los 20 días de desarrollo a  $27 \pm 1$  °C. Medias con letras distintas indican diferencias significativas para el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ( $n=6$ ).**

En cuanto a la producción de conidios, los resultados obtenidos en el aislamiento T63-02 son superiores a los encontrados por Ruiz *et al.* (2011), quienes al evaluar la esporulación de cinco cepas de *M. anisopliae* encontraron una producción de conidios que varió de  $3,93$  y  $8,56 \times 10^6$  conidios.mL<sup>-1</sup>. En otro estudio realizado por Torres *et al.* (2013), al caracterizar aislamientos nativos de *M. anisopliae* encontraron que el aislamiento MaA4 produjo  $174 \times 10^8$  conidios.mL<sup>-1</sup> producción superior a los obtenidos en el presente estudio.

De acuerdo a Torres *et al.* (2013) la selección de aislamientos con buen potencial genético en cuanto a producción de conidios, es un aspecto básico para la producción a escala comercial de hongos entomopatógenos.

En este mismo contexto varios autores (Tomas & Jenkins, 1997; García *et al.*, 2012) señalan que una alta producción de conidios hace más viable su comercialización y reduce los costos de su implementación en el campo. Por tanto, en los programas de control biológico uno de los aspectos más importantes es la producción masiva de conidios (Castro *et al.*, 2013), por lo que se busca que los sustratos permitan la producción del mayor número posible de conidios por gramo producido, a un menor costo (Pereira & Ira, 1999).

#### 4.1.4.3 Germinación de conidios

El análisis de varianza para el porcentaje de germinación mostró diferencias entre los aislamientos ( $p < 0,0013$ ) (Tabla 5). El aislamiento T63-08 fue significativamente superior a los aislamientos T63-11, T63-10, T63-09 y T63-01, pero no tuvo diferencias estadísticas con los demás aislamientos.

**Tabla 5. Porcentaje de germinación de conidios de los aislamientos de *Metarhizium* spp. a las 24 horas de la inoculación a  $27 \pm 1$  °C, ( $n=6$ ).**

<b>Aislamiento</b>	<b>Germinación conidios (%)</b>
T63-08	94,8 a
T63-02	92,8 ab
T63-07	92,2 ab
T63-03	91 ab
T63-06	90,4 ab
T63-05	90,4 ab
T63-04	89,8 ab
T63-11	85,8 b
T63-10	85,8 b
T63-09	85,8 b
T63-01	85,8 b
<b>E. E.</b>	1,69
<b>Valor de p</b>	0,0013

El porcentaje de germinación obtenido el aislamiento T63-08 es inferior a los obtenidos por Ruiz *et al.* (2011), quien obtuvo el 100% de germinación entre las 6 a 7 h de incubación en cinco aislamientos de *M. anisopliae*.

En otro estudio realizado por Obando *et al.* (2013) al evaluar la germinación de 13 cepas de *M. anisopliae*, verificaron que todas las cepas mostraron una germinación mayor al 90%.

De acuerdo a estos autores, este parámetro fisiológico es una característica deseable, debido a que las conidias de los hongos entomopatógenos deben presentar un rápido desarrollo del tubo germinativo, para acelerar el proceso infectivo y disminuir el tiempo de exposición a factores adversos como la radiación UV y humedad cuando son aplicadas en campo.

## 5. CAPITULO V.

### 5.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1.1. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron once aislamientos nativos de siete fincas en suelos de cultivos de caña azúcar de la parroquia Tarqui, los cuales son pertenecientes al género *Metarhizium*, según el color de las colonias, que son inicialmente blancas y posteriormente se tornan verdes olivas u oscuras cuando ya están esporuladas. Así como, por la forma de los conidios que son ovoides aceptados, agrupados en largas cadenas paralelas.
2. De los once aislamientos nativos de hongos entomopatógenos *Metarhizium* spp. diez presentaron características morfológicas similares, mientras que el aislamiento T63-02, se diferenció de los demás por tener las colonias superficie plana, que se torna verde oscuro con la esporulación, con presencia de esporulación abundante, bordes irregulares. Con respecto al tamaño de conidios de los aislamientos evaluados varió de 6 a 17  $\mu\text{m}$  de largo y de 2,5 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho.
3. En las características fisiológicas el aislamiento T63-02 obtuvo un mayor tamaño de colonias con un valor de 57,4, a su vez en la concentración de conidios el mismo aislamiento mostró el valor más alto de producción de conidios por placa de Petri ( $1,09 \times 10^8$  conidios.mL<sup>-1</sup>), de igual manera en la tasa de crecimiento el aislamiento T63-02, mostró el valor más alto de crecimiento (2,62 mm.día<sup>-1</sup>), mientras que en el porcentaje de germinación el aislamiento T63-08 fue significativamente superior (94,8%) a los demás aislamientos.

### **5.1.2. RECOMENDACIONES**

1. Se debe continuar con el estudio de caracterización del género *Metarhizium*, para incrementar el número de aislamientos, ya que existe un gran potencial de concentración de conidios en suelos de cultivo de caña de azúcar en la parroquia Tarqui, los cuales serían muy útiles para la obtención de cepas comerciales para control biológico de plagas.
2. Al momento de trabajar con hongos entomopatógenos es recomendable no realizar estudios de bacterias, porque estas son muy agresivas y contaminan el área de trabajo y los aislamientos.

## 6. CAPITULO VI.

### 6.1. BIBLIOGRAFÍA

- Ardila, Y. (2013). Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora (*Rubus glaucus* Benth.). Universidad Nacional de Colombia, Medellin. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9547/1/1024468926.2013.pdf>
- Arias, P. (2013). Uso de Plaguicidas en la Agricultura. Dirección e Estadísticas Agropecuarias y Ambientales, 6. Disponible en: [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas\\_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento\\_Tecnico-UsodePlaguicidas\\_en\\_la\\_Agricultura\\_2013.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento_Tecnico-UsodePlaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf)
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. (4ed). Minneapolis, US: Burgess Publishing Company. Disponible en: <https://trove.nla.gov.au/work/9226321?selectedversion=NBD14203571&q&versionId=46551487>
- Bastidas, L., Constante, J., Cuellar, E., Monroy, Y., Perpiñán, J., & Vivas, K. (2015). ISSUU. Hongos Entomopatógenos, 41. Disponible en: <https://issuu.com/virgiulloac/docs/186433813-hongos-entomopatogenos-li/58>
- Calle, G. (2013). Prospección de insectos plaga y sus controladores biológicos en el cultivo de caña panelera (*Saccharum Officinarum*). Pacto, Pichincha. Universidad Central del Ecuador, Quito. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1004/1/T-UCE-0004-6.pdf>
- Carvajal, V., & Troya, A. (2017). Hongos Entomopatógenos. Instituto de Ciencias Biologicas, Quito. Disponible en: <http://cienciasbiologicas.epn.edu.ec/index.php/hongos-entomopatogenos>
- Castro, S. M., González, R., Castaño, J., & Sanjuán, T. (2013). Evaluación de medios de cultivo para inducir esporulación de *Isaria Tenuipes* Peck. Agron., 21(1), 19-25. Disponible en: [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia21\(1\)\\_3.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia21(1)_3.pdf)
- CINCAE. (2013). Salivazo .Centro de Investigacion de la Caña De Azúcar. Disponible en: <http://cincae.org/areas-de-investigacion/manejo-de-plagas/salivazo/>
- CINCAE. (2013). Salivazo.Una división de la fundación para la investigación azucarera del Ecuador. Disponible en: <http://cincae.org/areas-de-investigacion/manejo-de-plagas/salivazo/>
- Cruz, W. d., & Cajilama, W. (2012). Control biológico del salivazo(Mahanarva andigena)en caña de azúcar(Saccharum officinarum) con *Metarhizium* sp.(Fungi: Ascomycota: Clavicipitaceae). Revista Amazónica Ciencia y Tecnología, 1(1), 1-9. Disponible en: <http://revistas.proeditio.com/REVISTAMAZONICA/article/view/157/135>
- Díaz, S. (2014). Control Biológico de Plagas. AgroHuerto. Disponible en: <https://www.agrohuerto.com/control-biologico-de-plagas/>
- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., & Mueke, J. M. (2004). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. BioControl, 49, 83-94. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/226217743\\_Effect\\_of\\_constant\\_temperatures\\_on\\_germination\\_radial\\_growth\\_and\\_virulence\\_of\\_Metarhizium\\_anisopliae\\_to\\_three\\_species\\_of\\_African\\_tephritid\\_fruit\\_flies](https://www.researchgate.net/publication/226217743_Effect_of_constant_temperatures_on_germination_radial_growth_and_virulence_of_Metarhizium_anisopliae_to_three_species_of_African_tephritid_fruit_flies)

- Estrada, M., & Velez, P. (2003). Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 70, 97-103: Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/reprodoc/A1939e/A1939e.pdf>
- Fernandes, E. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E., Miller, M. P., & Roberts, D. W. (2010). Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 115–128. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04422.x/pdf>
- GADPR. (2015). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Tarqui. Disponible en: [http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplustdocumentofinal/0160026230001\\_PDOT%20TARQUI%202015\\_29-10-2015\\_22-19-52.pdf](http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplustdocumentofinal/0160026230001_PDOT%20TARQUI%202015_29-10-2015_22-19-52.pdf)
- García, A. (2008). Proyecto de creación y puesta en marcha de la empresa bioinsumos de Colombia Ltda. Universidad La Salle, Bogota. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/15931/T43.08%20G165p.pdf?sequence=1>
- García, M., Cappello, S., Leshner, J., & Molina, R. (2011). Redalyc. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*, 10(2) 21-28. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4578/457845138002.pdf>
- García, A. M., Bustillo, A. E., Castro, U., & Arenas, Y. (2012). Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (*Hemiptera: Cercopidae*) de la caña de azúcar en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 252-259. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v38n2/v38n2a15.pdf>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). Manual de producción y uso de Hongos Entomopatógenos. Servicio Laboratorio De Entomopatógenos, Peru. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%B3genos.pdf>
- Gómez, P., & Mendoza, J. (2013). (CINCAE) Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*, 5. Disponible en: <https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Producci%C3%B3n-Metarhizium-anisopliae-Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B05.pdf>
- González, M., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2012). Control de insectos-plaga en la agricultura. *Acta Química Mexicana (AQM)*, 4(8), 42-55. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM8/5.pdf>
- Gualotuña, L. (2013). Identificación de variedades de caña panelera (*Saccharum Officinarum*) en cuatro provincias del país para formar un banco de Germoplasma en pacto, Pichincha. Universidad Central Del Ecuador, Quito. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1040/1/T-UCE-0004-16.pdf>
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S., & Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28(2): 87-96. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf>

- Hernández, A. (2016). Evaluación de Hongos Entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control de hormigas cortadoras de hojas (*Atta* Spp) En Eucalipto; Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Universidad Rafael Landívar, Escuintla. Disponible en:  
<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2016/06/17/Hernandez-Alex.pdf>
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.). Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition) (pp. 151-187). San Diego: Academic Press. Disponible en: <http://file.zums.ac.ir/ebook/705-Manual%20of%20Techniques%20in%20Invertebrate%20Pathology,%20Second%20Edition=Lawrence%20A.%20Lacey=0123868998=A.pdf>
- Kalm, E., & Kalyoncu, F. (2008). Mycelial growth rate of some morels (*Morchella* spp.) in four different microbiological media. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 3(6): 861-864. Disponible en:  
[https://www.idosi.org/aejaes/jaes3\(6\)/11.pdf](https://www.idosi.org/aejaes/jaes3(6)/11.pdf)
- Martínez, N. (2010). Manejo Integrado de Plagas: Una Solución a la Contaminación Ambiental. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 8(1): 73-82. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375740246010>
- Mendoza Mora, J., Mejía Moreira, K., & Gualle Alvarado, D. (2004). El Salivazo de la Caña de Azúcar Mahanarva Andígena (*Homoptera, Cercopidae*). Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. Disponible en:  
<https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B0-4-Salivazo.pdf>
- Mendoza, J., & Garcés, F. (2013). Principales plagas y enfermedades exóticas de la caña de azúcar, en Ecuador. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. Disponible en: <https://www.google.com.ec/search?q=principales+plagas+y+enfermedades+exoticas+de+la+ca%C3%B1a+de+azucar+en+el+ecuador&oq=p&aq=s=chrome.0.69i59j69i61j69i60l2j69i59j69i60.1660j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Merchán, X. (2015). Control Biológico con Hongos Entomopatógenos: Una estrategia de aula para promover el cuidado del Medio Ambiente( Tesis maestría). Universidad Nacional De Colombia. Bogotá. Disponible en:  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/52287/1/xiomaralissetmerchandgado.2015.pdf>
- Mondino, P. (2012). Métodos de Aislamientos. Unidad de Fitopatología, Facultad Agronomía. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/05-Metodos%20de%20aislamiento.pdf>
- Nava, E., García, C., Camacho, J., & Vásquez, E. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. 8(3): 17-29. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177003.pdf>
- Obando, J.A., Bustillo, A.E., Castro, U., & Mesa, N. C. (2013). Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (*Hemipetra: Cercopidae*). Revista Colombiana de Entomología. 39(1):26-33. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v39n1/v39n1a05.pdf>

- Ojeda, M., Rodríguez, R., Galindo, E., Lezama, R., & Cruz, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2(2): 177-192. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S200711242011000200005&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S200711242011000200005&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Pereira, S. R., & Eira A. F. (1999). Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. *Ciência Rural*, 29(3), 389-394. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v29n3/a02v29n3.pdf>
- Pik, K. H., Choon, J. B., Kadir, J., & Amartalingam, R. (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) Isolates and their effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 289-297. Disponible en: <http://thescipub.com/PDF/ajabssp.2009.289.297.pdf>
- Puerto, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). *Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud*. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52(3), 372-387: Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032014000300010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010)
- Rachappa, V., Lingappa, S., & Patil, R. K. (2007). Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal Agricultural Science*, 20(2): 410-413. Disponible en: <http://14.139.155.167/test5/index.php/kjas/article/viewFile/969/962>
- Rodríguez, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* . 52(3): 372-387. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>
- Rodríguez, D. (2016). Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades de la Caña de Azúcar. Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura (Intagri). Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-integrado-de-plagas-y-enfermedades-de-la-cania>
- Rodríguez, J. (2017). Los Entomopatógenos, Control Biológico de Plagas. Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura (Intagri). Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/los-entomopatogenos-control-biologico-de-plagas>
- Rojas-Gutiérrez, R. L., Loza-Murguía, M., Vino-Nina, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1):48-68. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1\\_a04.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a04.pdf)
- Ruiz-Sánchez, E., Chan-Cupul, W., Pérez Gutiérrez, A., Cristóbal-Alejo, J., Uch-Vázquez, B., Tun-Suárez, J., & Munguía-Rosales, R. (2011). Crecimiento, esporulación y germinación in vitro de cinco cepas de *Metarhizium* y su virulencia en huevos y ninfas de *Bemisia tabaco*. *Revista mexicana de micología*, 33: 9-15. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v33/v33a3.pdf>
- Schapovaloff, M. (2012). Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia

- de Misiones ( Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata. La Palata. Disponible en: [http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/\\_documentos/tesis/tesis\\_1236.pdf](http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/_documentos/tesis/tesis_1236.pdf)
- Skalický, A., Bohatá, A., Šimková, J., Lance, S., Osborne, L. S., & Landa, Z. (2013). Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiol.* DOI 10.1007/s12223-013-0293-z. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/259322487\\_Selection\\_of\\_indigenous\\_isolates\\_of\\_entomopathogenic\\_soil\\_fungus\\_Metarhizium\\_anisopliae\\_under\\_laboratory\\_conditions](https://www.researchgate.net/publication/259322487_Selection_of_indigenous_isolates_of_entomopathogenic_soil_fungus_Metarhizium_anisopliae_under_laboratory_conditions)
- Thomas, M. B., & Jenkins, N. E. (1997). Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the *variegated grasshopper*, *Zonocerus variegatus*. *Mycological Research*, 101(2), 1469-1474. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095375620860814X>
- Torres, M., Cortez, H. M., Ortiz, C. F., Capello, S., & De la Cruz, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 40-46. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v39n1/v39n1a07.pdf>
- Uribe, S., & Felizzola, J. (2014). *Efectos de los plaguicidas en el medio ambiente*. Prezi. Disponible en: <https://prezi.com/p7jtu6mbh8it/efectos-de-los-plaguicidas-en-el-medio-ambiente/>
- Urrea, F. (2015). Hongos entomopatogenos como control de plagas de insectos. Disponible en: <http://www.mnhn.cl/613/w3-article-52193.html>
- Valencia, C. (2015). Caracterización de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* asociados a insectos plaga de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49760/1/TESIS%20HONGOS%20ENTOMOPATGENOS.pdf>
- Valle, S., Imparraguirre, M., Puertas, A., Rodríguez, S., & Caicedo, W. (2014). Dinámica poblacional y efecto del deshoje en la disminución de ninfas de *Mahanarva andigena* en el cultivo de caña de azúcar. *Revista Amazonica Ciencia y Tecnología*, 3(1):49-62. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/318967328\\_Dinamica\\_poblacional\\_y\\_efecto\\_del\\_deshoje\\_en\\_la\\_disminucion\\_de\\_ninfas\\_de\\_Mahanarva\\_andigena\\_en\\_el\\_cultivo\\_de\\_cana\\_de\\_azucar](https://www.researchgate.net/publication/318967328_Dinamica_poblacional_y_efecto_del_deshoje_en_la_disminucion_de_ninfas_de_Mahanarva_andigena_en_el_cultivo_de_cana_de_azucar)
- Valle, S. (2015). Particularidades Bioecológicas de *Mahanarva Andigena* (Jacobi) como base para el manejo con *Metarhizium Anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en la caña de azúcar *Saccharum* Spp. Híbrido en Pastaza, Ecuador. (Tesis doctoral). Universidad de Granma. Bayamo. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/2427/1/T-SENESCYT-01210.pdf>