



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos presentes en el suelo de las diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: José Alejandro Ortiz Villacís

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís, PhD.

Ambato – Ecuador

Septiembre 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís, PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de Titulación bajo la modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 29 de Julio de 2021

Dr. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I.: 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, José Alejandro Ortiz Villacís, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



José Alejandro Ortiz Villacís

C.I.: 1805140504

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firma:

Presidente del Tribunal

Ing. Mg. Juan de Dios Espinoza Moya

C.I. 1803201431

Ing. Mayra Fernanda Chico Terán, MSc.

C.I. 1003327044

Ambato, 27 de Agosto del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature reads "José Ortiz".

José Alejandro Ortiz Villacís

C.I.: 1805140504

AUTOR

DEDICATORIA

A Dios, por guiar cada paso y decisión tomada en los momentos más difíciles.

A mis Angelitos, que desde lo alto me cuidaron y fortalecieron. Todos los días están presentes en mí.

A mi hermano, Xavier por su confianza y motivación.

A toda mi familia, por su apoyo y atención.

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología que me dieron la oportunidad de ser parte de ellas.

A la Empresa BiosebOrganics por la gran oportunidad de colaborar con profesionales de excelencia.

A Raquel Jurado, gracias por estar siempre conmigo. Sus consejos y charlas de motivación ahora tienen su recompensa.

A mis amigos y compañeros, por las experiencias vividas dentro y fuera de los salones de clase.

Al Dr. Mario García por el conocimiento impartido y disposición para guiar este trabajo.

Finalmente, a todos los docentes por sus enseñanzas académicas y formación profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1. Manejo Integrado de plagas.....	1
1.1.2. Técnicas de control del MIP	1
1.1.3. Hongos entomopatógenos.....	3
1.1.4. Modo de acción de los hongos entomopatógenos	7
1.1.5. Métodos de aislamiento de Hongos Entomopatógenos.....	10
1.1.6. Caracterización	13
1.2. OBJETIVOS	16
1.2.1. Objetivo General.....	16
1.2.2. Objetivos específicos	16
1.3. Hipótesis	16
1.3.1. Hipótesis nula	16
1.3.2. Hipótesis alternativa	16
1.3.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis	17
CAPITULO II.....	18
METODOLOGÍA.....	18
2.1. Localización.....	18
2.2. Materiales.....	18
2.2.1. Material de laboratorio	18
2.2.2. Reactivos	19
2.2.3 Tecnológicos	19

2.3. Métodos.....	20
2.3.1. Población y Muestra.....	20
2.3.2. Cultivo de <i>Galleria mellonella</i>	21
2.3.3. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos.....	22
2.3.4. Almacenamiento y conservación de cultivos puros de hongos entomopatógenos.....	23
2.3.5. Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	23
2.2.6. Caracterización microscópica de los aislamientos	23
CAPITULO III	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1. Análisis y discusión de los resultados.....	24
3.1.1. Establecimiento del cultivo puro de <i>Galleria mellonella</i> a nivel de laboratorio.	24
3.1.2. Muestreo en las zonas agrícolas de Tungurahua	28
3.1.3. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos presentes en diferentes muestras de suelo.....	30
3.1.4. Caracterización de los hongos entomopatógenos aislados.....	37
3.2. Verificación de la hipótesis.....	50
CAPÍTULO IV	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
4.1. Conclusiones	51
4.2. Recomendaciones	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de hongos entomopatógenos	7
Figura 2. Muerte de larva ocasionada por <i>Beauveria bassiana</i>	9
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Galleria mellonella</i>	12
Figura 4. Morfología macroscópica de <i>Paecilomyces fimosoroseus</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	13
Figura 5. Colonias de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14

Figura 6. Morfología microscópica de <i>Beauveria bassiana</i>	15
Figura 7. Morfología de <i>Paecilomyces fimosoroseus</i>	15
Figura 8. Morfología microscópica de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
Figura 9. Cultivo de <i>Galleria mellonella</i>	25
Figura 10. Colocación de los adultos <i>Galleria mellonella</i> junto con un panal de abejas.26	
Figura 11. Ciclo biológico de <i>Galleria mellonella</i>	27
Figura 12. Laboratorio de Cultivo in vitro de la Empresa BIOSEBORGANICS CIA. LTDA.....	28
Figura 13. Mapa de la Provincia de Tungurahua donde se señalan los sitios muestreados	29
Figura 14. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos	31
Figura 15. <i>Galleria mellonella</i> infectada por hongos entomopatógenos,.....	34
Figura 16. Contaminación de <i>Galleria mellonella</i> por hongos ambientales y bacterias34	
Figura 17. Porcentaje de resultados positivos a la presencia de hongos entomopatógenos del total de muestras de suelo recolectadas	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	4
Tabla 2. Taxonomía de <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
Tabla 3. Taxonomía de <i>Paecilomyces fimosoroseus</i>	6
Tabla 4. Taxonomía de <i>Galleria mellonella</i>	11
Tabla 5. Datos del lugar de recolección.....	20
Tabla 6. Géneros de hongos aislados de las diferentes muestras de suelo	32
Tabla 7. Resumen de cepas aisladas de tres géneros de hongos entomopatógenos encontradas en diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua	35
Tabla 8. Principales características macroscópicas de aislados de hongos entomopatógenos obtenidos.....	37
Tabla 9. Hongos entomopatógenos aislados en la semana 3	42
Tabla 10. Principales características microscópicas de aislados de hongos entomopatógenos.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestras de suelo.	59
Anexo 2. Monitoreo diario de <i>G. mellonella</i> en muestra de suelo.	59
Anexo 3. Medios PDA	59
Anexo 4. Aislamientos y purificaciones de hongos entomopatógenos	60
Anexo 5. Almacenamiento y conservación de cepas puras en Glicerol al 20%	60
Anexo 6. Crecimiento de los hongos entomopatógenos identificados, a lo largo de 1, 2 y 3 semanas	61
Anexo 7. <i>Beauveria</i> spp. de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua	61
Anexo 8. Resumen de aislamientos de <i>Metarhizium</i> spp. de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua	62
Anexo 9. Resumen de aislamientos de <i>Paecilomyces</i> spp. de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua	62

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Empresa BIOSEBORGANICS CIA. LTDA., en el periodo noviembre 2020 – mayo 2021. Se recolectaron 23 muestras de suelo de diferentes sectores agrícolas de la Provincia de Tungurahua: Pelileo (6), Santa Rosa (4), Unamuncho (6) y Quisapincha (7). Larvas de *Galleria mellonella* fueron empleadas como trampa cebo para detectar, aislar y purificar hongos entomopatógenos, llegando a obtener 200 larvas para evaluar por generación. En base a la caracterización macroscópica y microscópica el porcentaje de 56.52 de muestras dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de hongos. *Metarhizium sp.* fue detectado en 10 cepas (porcentaje de 45,45) presentando características algodonosa de color verde olivo en el centro, micelio irregular y una coloración amarillo verdoso al reverso; conidióforos ramificados en forma de candelabro con dos o tres ramas cada uno, conidios cilíndricos ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente. *Beauveria sp.* en 7 cepas (porcentaje 31,82) con una textura algodonosa de color blanco, micelio irregular y una coloración amarilla al reverso; células conidiogénicas típicas de la especie y conidios sub globosos-elipsoidales y *Paecilomyces sp.* en 5 cepas (porcentaje igual a 22,73) de textura inicial algodonosa de color marrón grisáceo, micelio irregular y color crema al reverso; presentó conidióforos ramificados con hasta seis fiálides y conidio ovoide. Estos hongos entomopatógenos encontrados en las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua abren campo para el control de plagas que afectan los cultivos de la región mediante la Biotecnología.

Palabras clave: Control biológico, Hongos entomopatógenos, Suelos agrícolas, *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

The research was developed in the in vitro culture laboratory of the BIOSEBORGANICS CIA Company. LTDA., In the period November 2020 - May 2021. 23 soil samples were collected from different agricultural sectors of the Province of Tungurahua: Pelileo (6), Santa Rosa (4), Unamuncho (6) and Quisapincha (7). *Galleria mellonella* larvae were used as a bait trap to detect, isolate and purify entomopathogenic fungi, obtaining 200 larvae to evaluate per generation. Based on the macroscopic and microscopic characterization, the percentage of 56.52 samples gave positive results regarding the presence of fungi. *Metarhizium* sp. It was detected in 10 strains (percentage of 45.45) presenting cottony characteristics of olive green color in the center, irregular mycelium and a greenish-yellow coloration on the reverse; Candelabrum-shaped branched conidiophores with two or three branches each, slightly ellipsoidal cylindrical conidia, forming long chains, some attached laterally. *Beauveria* sp. in 7 strains (percentage 31.82) with a white cottony texture, irregular mycelium and a yellow coloration on the reverse; conidiogenic cells typical of the species and sub globose-ellipsoidal conidia and *Paecilomyces* sp. in 5 strains (percentage equal to 22.73) of cottony initial texture of grayish brown color, irregular mycelium and cream color on the back; It presented branched conidiophores with up to six phialides and ovoid conidia. These entomopathogenic fungi found in the different agricultural areas of Tungurahua open the field for the control of pests that affect the crops of the region through Biotechnology.

Keywords: Biological control, Entomopathogenic fungi, Agricultural soils, *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp., *Galleria mellonella*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Manejo Integrado de plagas

El manejo integrado de plagas, o MIP, nació en 1960 como una necesidad debido a las consecuencias devastadoras que resultaban del uso excesivo de insecticidas. Es por ello que busca principalmente eliminar y evitar el daño por plagas a través de técnicas en donde se aprovecha a los depredadores o parasitoides naturales, y solamente en casos extremos y de ser estrictamente necesario, los insecticidas o plaguicidas **(Romero, 2004)**.

El MIP debe seguir una secuencia establecida en donde se debe tomar en cuenta varios aspectos como son la planeación, integración y aplicación, evaluación económica y finalmente una evaluación ecológica con la finalidad de identificar y cuantificar el impacto que ha tenido las tácticas empleadas. Todo este proceso busca disminuir las plagas evitando atentar contra el ecosistema y alterarlo **(Romero, 2004)**.

1.1.2. Técnicas de control del MIP

1.1.2.1. Control químico

El control químico se basa en el uso de insecticidas o pesticidas siempre y cuando sea estrictamente necesario ya que en ocasiones su uso es de acción rápida lo cual prevendría una expansión acelerada de la plaga **(FAO, 2002)**.

1.1.2.2. Control biológico

El control biológico se basa en el uso y aprovechamiento de patógenos, parasitoides y depredadores naturales que eliminan o disminuyen notoriamente las plagas **(FAO, 2002)**. Este control es específico ya que se verá afectada únicamente la plaga a la que se quiere eliminar, además de ser seguro tanto para el hombre como para el ecosistema en general **(Rubio & Fereres, 2017)**.

1.1.2.2.1. Enemigos naturales de plagas

Los principales enemigos de las plagas son los hongos, bacterias, avispas y mariquitas:

- Los hongos controlan y eliminan plagas mediante la colonización de sus órganos y tejidos. Por ejemplo, *Bauveria bassiana* es capaz de eliminar mariposas y coleópteros **(Chiriboga, Gómez, & Garcés, 2015)**.
- Las bacterias suelen actuar de diferentes formas. Por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* reduce el apetito de los gusanos y larvas provocando la muerte de estas **(Romero, 2004)**.
- Las avispas, por su parte, colocan en las plagas sus huevos, impidiendo la expansión de estas ya que las larvas los consumen como alimento **(FAO, 2002)**.
- Las mariquitas son conocidas debido a que estas se alimentan de pulgones eliminándolos en grandes cantidades **(FAO, 2002)**.

1.1.2.3. Control biotecnológico

El control biotecnológico se basa en estimular a la plaga a través de aspectos químicos o físicos como, reguladores de crecimiento, antibióticos, luz, entre otros **(FAO, 2002)**.

1.1.2.4. Control tecnológico

El control tecnológico busca implementar elementos físicos o tecnológicos con la finalidad de atraer y atrapar a los insectos plaga. Esto se puede realizar mediante trampas, mallas, entre otros (FAO, 2002).

1.1.2.5. Control ecológico

Finalmente, el control ecológico busca atender al cultivo desde el inicio, teniendo sumo cuidado en los sustratos a utilizar y a lo largo de todo el proceso, incluyendo la cosecha y poscosecha (FAO, 2002).

1.1.3. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos abundan en la naturaleza. Se los puede encontrar en el estiércol, suelo o plantas. Logran un óptimo desarrollo en lugares con poco sol, frescos y húmedos. Se los cataloga como los controladores biológicos de mayor importancia, por la susceptibilidad de los insectos a contraer enfermedades a causa de estos (Monzón, 2001)

Se ha identificado más de 750 especies, correspondientes a casi 100 géneros, con capacidad de causar infecciones a los insectos. Sin embargo, el estudio y uso comercial se ha centrado en *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fimosoroseus* (Pucheta, Flores, Rodríguez, & De la Torre, 2006)

1.1.3.1. Beauveria bassiana

1.1.3.1.1. Características

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno que se caracteriza por enfermar a los insectos plaga produciéndole la muscardina blanca, una enfermedad en donde el hongo

penetra al insecto por la cutícula atacando los tejidos del mismo, desarrollándose internamente y cubriendo su cuerpo con una capa de micelios y conidios lo cual da una apariencia de momificación del insecto (Castillo, y otros, 2012).

1.1.3.1.2. Taxonomía

La tabla 1, resume la taxonomía de *Beauveria bassiana*:

Tabla 1. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Reino	Fungi
División	Amastigomicotina
Sub-división	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycete
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>Bassiana</i> (Balsamo) <i>Vuillemin</i>

Fuente: (Noboa & Quelal, 2015)

1.1.3.1.3. Morfología

“*Beauveria bassiana*, es un hongo imperfecto, posee hifas septadas que contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre los cuales se desarrollan las conidias” (Hernández & Berlanga, 1999, pág. 1). Este hongo tiene la apariencia de algodón blanco, cambiando a amarillo mientras se desarrolla y culminando con un color crema polvoriento (Noboa & Quelal, 2015).

1.1.3.2. *Metarhizium anisopliae*

1.1.3.2.1. Características

Metarhizium anisopliae es uno de los principales hongos entomopatógenos debido a que cuenta con un rango muy amplio en cuanto a los insectos que puede infectar, por lo cual es utilizado con mayor frecuencia como bioinsecticida. Además, al igual que *Beauveria bassiana*, este hongo penetra al insecto, desarrollándose internamente y cubriendo su cuerpo con una capa de micelios y conidios, atacando principalmente a las plagas de lepidópteros lo cual resulta en una gran importancia agrícola (Jiménez, Gutiérrez, Rosas, López, & Saínz, 2015).

1.1.3.2.2. Taxonomía

La Tabla 2, resume la taxonomía de *Metarhizium anisopliae*.

Tabla 2. Taxonomía de *Metarhizium anisopliae*

Super reino	Eukaryota
Reino	Fungi
Sub-reino	Dikarya
Filum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Género	Metarhizium
Especie	Anisopliae
Nombre binomial	Metarhizium anisopliae
Nombre común	Hongo de la muscardina verde

Fuente: (Gandarilla, 2012).

1.1.3.2.3. Morfología

“*Metarhizium anisopliae* presenta hialides6ro ramificado, conidias cilíndricas a ovales que se forman en cadenas originadas en fialides. Las conidias son producidas en sucesión basipétala, estando la conidia más joven en la base de la cadena” (Gómez et al., 2014).

1.1.3.3. *Paecilomyces fimosoroseus*

1.1.3.3.1. Características

Paecilomyces fimosoroseus es un hongo entomopatógeno que se caracteriza por tener tolerancia a una gran variedad de pesticidas. Es por ello que suele ser utilizado en programas de MIP. Este hongo suele ser utilizado mayoritariamente en controlar la mosquita blanca, la mariposa del dorso del diamante, las termitas y las mariposas del durazno (Castillo, 2002).

1.1.3.3.2. Taxonomía

La Tabla 3, resume la taxonomía de *Paecilomyces fimosoroseus*.

Tabla 3. Taxonomía de *Paecilomyces fimosoroseus*

Phylum	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycetes
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyfomycetidae
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae

Fuente: (Castro, 2010).

1.1.3.3. Morfología

“El género *Paecilomyces sp.* presenta hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de 7ialides, las cuales pueden ser solitarias” (Chan, 2009, pág. 16).

1.1.4. Modo de acción de los hongos entomopatógenos

En la Figura 1, se observa el modo de acción de los hongos entomopatógenos. Este se basa en ocho etapas descritas a continuación.

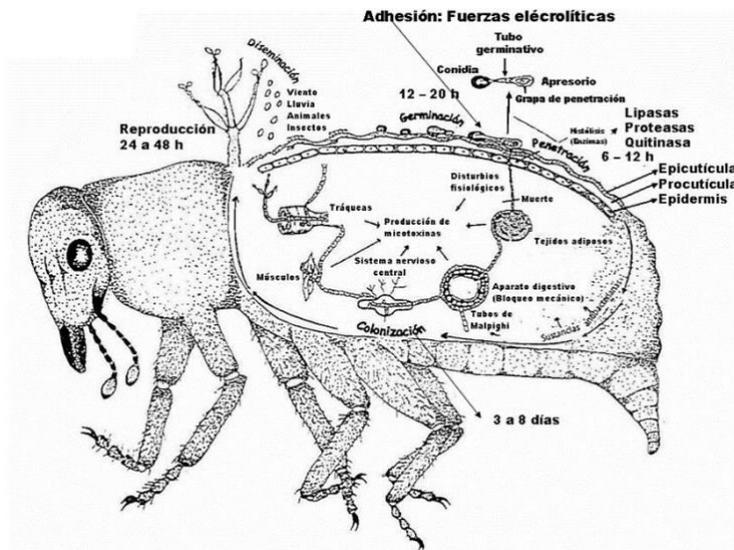


Figura 1. Modo de acción de hongos entomopatógenos

Fuente: (Gómez et al., 2014).

1.1.4.1. Adhesión

El hongo se adhiere a la pared del insecto a través de las esporas, las cuales son colocadas en la superficie del mismo. Estas pueden llegar a través del ser humano, animales, lluvia o del viento (Téllez et al., 2009).

1.1.4.2. Germinación

Los conidios germinan e inician el desarrollo de un tubo germinativo para posteriormente formar un órgano apresorio el cual le permitirá sujetarse al insecto (Téllez et al., 2009).

1.1.4.3. Penetración

La penetración del hongo al insecto se da en un tiempo promedio de 10 horas. Este proceso se produce por la acción de mecanismos tanto físicos como químicos. Los mecanismos físicos incluyen la mecano presión que el tubo germinativo ejerce sobre la cutícula, el cual romperá las membranas de la misma. A este evento le sigue la digestión química a través de las enzimas quitinasas, lipasas y proteasas. Estas proteínas degradarán los tejidos de la cutícula facilitando la penetración del hongo en el insecto plaga (Gómez et al., 2014).

1.1.4.4. Producción de toxinas

Los hongos entomopatógenos son capaces de producir toxinas con propiedades insecticidas, estas pueden ser metabolitos secundarios o enzimas como las quitinasas, amilasas, glicogenasas y lipasas. Dichas toxinas son expulsadas en el interior del insecto ocasionando la degeneración de tejidos, deshidratación celular y la muerte del mismo (Gómez et al., 2014). Un ejemplo de ello es la toxina Beauvericina la cual es producida por *Beauveria bassiana*, esta inhibe la reacción del sistema inmune del insecto, ayudando a que el hongo pueda invadirlo fácilmente (Téllez et al., 2009).

1.1.4.5. Muerte

El insecto muere antes de la colonización completa del hongo, debido generalmente a la destrucción de los tejidos. El tiempo en que ocurre la muerte del insecto está estrechamente relacionado con las condiciones ambientales, el insecto y el hongo entomopatógeno utilizado (Gómez et al., 2014).

1.1.4.6. Colonización

Al morir el insecto, el micelio del hongo coloniza todos sus tejidos y órganos. Este proceso dura un promedio de 5 días en donde el insecto no se descompondrá debido a sustancias antibacteriales que produce el hongo (**Gómez et al., 2014**).

La figura 2, muestra a una larva infectada por *Beauveria bassiana*, esta se encuentra en la sexta etapa de su modo de acción en donde, al haber muerto el hospedero, se multiplican las hifas invadiendo la totalidad de los tejidos del insecto. Es por ello que tiene un aspecto de momia (**Téllez et al., 2009**).



Figura 2. Muerte de larva ocasionada por *Beauveria bassiana*

Fuente: (**Téllez et al., 2009**).

1.1.4.7. Esporulación

La producción de esporas se da en 48 horas después de que las hifas del hongo han emergido al exterior del insecto. Este tiempo variará dependiendo de la humedad ambiental (**Gómez et al., 2014**).

1.1.4.8. Diseminación

Finalmente, las esporas producidas serán esparcidas a nuevos insectos a través del ser humano, animales, lluvia o del viento (**Gómez et al., 2014**).

1.1.5. Métodos de aislamiento de Hongos Entomopatógenos

El aislamiento de hongos entomopatógenos se basa en obtener y aislar el hongo de un inóculo, el cual por lo general puede ser parte de una planta, insectos, o suelo. Una consideración de suma importancia durante el proceso de aislamiento de hongos es tener un cultivo monospórico. Esto se basa en el hecho de que, al realizar un proceso de producción masiva, el hongo debe poder desarrollarse vigorosamente y se debe contar con la seguridad de que el cultivo está libre de contaminantes. Es importante considerar que el muestreo debe hacerse en zonas libre de aplicaciones comerciales de estos hongos (**Galán, 2012**).

El proceso de aislamiento de hongos entomopatógenos incluye la colección de la muestra, el aislamiento mediante insectos, la aplicación de diluciones seriadas, el aislamiento mediante métodos selectivos y el establecimiento de cultivos puros en el laboratorio. Finalmente, los hongos aislados son identificados mediante claves macro y microscópicas o mediante taxonomía sistemática.

1.1.5.1. Aislamiento directo

El aislamiento directo consiste en obtener el hongo del insecto para pasarlo directo al medio nutritivo, este método va acompañado de una desinfección previa con hipoclorito de sodio (3 – 5%) como manera de eliminar la contaminación, ya que la contaminación es una desventaja característica de este método. Se la puede realizar mediante un raspado con un asa sobre la superficie del hongo – insecto y su inoculación en un medio sintético. Otra manera de aislar el hongo directamente del insecto consiste en tomar con una pinza estéril la muestra y realizar agitaciones en la superficie del medio (**Monzón, 2001**).

1.1.5.2. Aislamiento mediante insectos trampa

Esta metodología depende del suelo y el cultivo que se encuentre en el mismo. El método consiste en tomar muestras de la rizosfera de un cultivo de interés y su almacenamiento bajo

sombra. Según **González et al. (2016)** es recomendable colocar insectos altamente susceptibles a especies de entomopatógenos en las muestras de suelo. Mediante esto se reduce significativamente errores por contaminaciones de otros organismos (**Galán, 2012**). Una de las ventajas de este método es la obtención de cepas con particular especificidad por la acción directa de insecto – hongo (**Berumen, 2017**).

1.1.5.2.1. *Galleria mellonella*

Galleria mellonella es utilizada como un método de aislamiento de hongos entomopatógenos, ya que puede ser utilizado como un insecto trampa. *Galleria mellonella* es una plaga lepidóptera conocida como polilla de cera y es una de las causas comunes de la fuga, destrucción de colonias y disminución del tamaño del enjambre de las abejas. Su uso recalca en la facilidad de ser criada en el laboratorio al no requerir alta inversión de tiempo (**Restrepo, Arias, & Soto, 2019**), y tener resultados positivos en la evaluación de hongos entomopatógenos del género *Beauveria* y *Metarhizium* (**De la Cruz, Cortez, Ortiz, Cappello, & Pérez, 2014**).

1.1.5.2.1.1. Taxonomía de *Galleria mellonella*

La tabla 4 resume la taxonomía de *Galleria mellonella*.

Tabla 4. Taxonomía de *Galleria mellonella*.

Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Insecta</i>
Orden	<i>Lepidoptera</i>
Superfamilia	<i>Pyraloidea</i>
Familia	<i>Pyralidae</i>
Genero	<i>Galleria</i>
Especie	<i>G. mellonella</i>

Fuente: (Rodríguez, 2015)

1.1.5.2.1.2. Ciclo de vida de *Galleria mellonella*

El ciclo biológico de *Galleria mellonella* es corto, durando aproximadamente 6 semanas, sobre todo en condiciones constantes de humedad y alta temperatura que se pueden generar en el laboratorio. Como se observa en la figura 3, el ciclo de vida de *Galleria mellonella* inicia con los huevos depositados por los adultos en las celdas de colmenas. Las larvas emergerán en un promedio de 4 días (Rodríguez, 2015). En los próximos 19 días, las larvas se desarrollarán y estarán listas para empupar siempre y cuando se encuentren a una temperatura óptima de 32°C. Cuando la temperatura es muy baja pueden tardar hasta 4 – 5 meses para alcanzar el estado de pupa. A continuación, bajo condiciones ambientales adecuadas, los adultos saldrán del capullo en aproximadamente 12 días para reproducirse y comenzar un nuevo ciclo (Rodríguez, 2015).

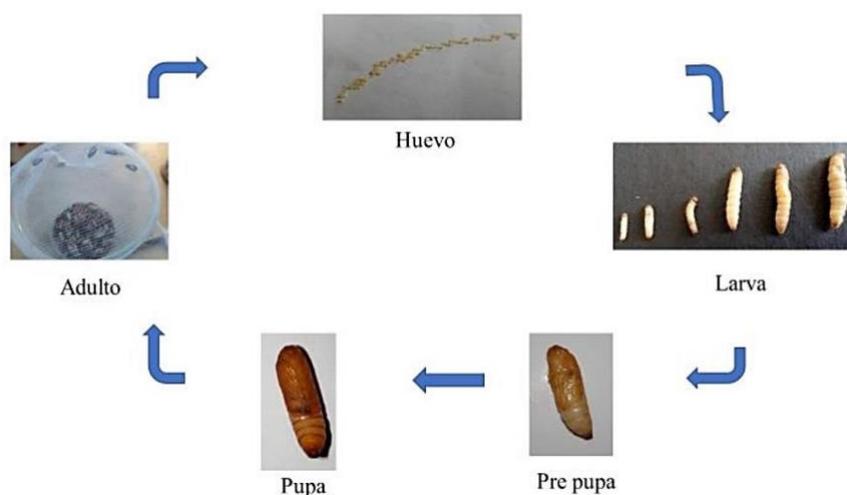


Figura 3. Ciclo biológico de *Galleria mellonella*

Fuente: (Bazán & Wilson, 2017).

1.1.5.3. Dilución seriada

Consiste en introducir un insecto infectado por el hongo y que haya esporulado, en un tubo de dilución con 10 ml de agua estéril y Tween 80 al 0,1%. De la solución concentrada del inóculo se preparan diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Por último, para la obtención del hongo

se debe sembrar en el medio de cultivo las últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) (González, Aguilar, & Rodríguez, 2012).

1.1.6. Caracterización

1.1.6.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica se basa en observar y analizar las características de los hongos entomopatógenos sin necesidad del uso de microscopio. Las características para observar incluyen aspectos como el color (por ambas caras), la textura, la forma y el tamaño de la colonia formada por el hongo entomopatógeno sobre un medio de cultivo (Castillo, 2002).

Beauveria bassiana y *Paecilomyces fimosoroseus* se caracterizan por tener colonias de color blanco que van cambiando a tonos cremas o rosado y con la edad se tiñen de un color gris. El revés de *P. fimosoroseus* suele ser amarillento cambiando a un color naranja, mientras que de *B. bassiana* es de color amarillo y en el centro rojizo. En la figura 4, se puede observar la morfología macroscópica al derecho y revés de, *Paecilomyces fimosoroseus*, en la columna izquierda y *Beauveria bassiana*, en la derecha (Cañedo, 2004).

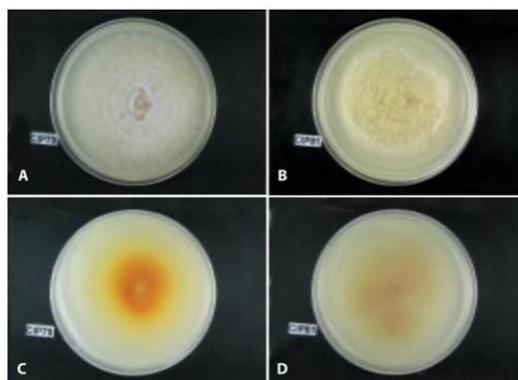


Figura 4. Morfología macroscópica de *Paecilomyces fimosoroseus* y *Beauveria bassiana*. Los paneles A y C corresponden al crecimiento de *Paecilomyces fimosoroseus* observados por el derecho y revés, respectivamente. Los paneles B y D corresponden al crecimiento de *Beauveria*.

Fuente: (Cañedo, 2004).

A diferencia de estos, *Metarhizium anisopliae* forma colonias de un color verde o amarillo verdoso, el cual va oscureciéndose con la edad, mientras que su color por el revés es marrón o verdoso (figura 5). La textura de estos hongos entomopatógenos suele ser algodonosa o polvorienta (**Gómez et al., 2014**).



Figura 5. Colonias de *Metarhizium anisopliae*

Fuente: (Gómez et al., 2014).

1.1.6.2. Caracterización microscópica

En la caracterización microscópica se observa y diferencia los hongos entomopatógenos, teniendo en cuenta la morfología de cada uno vistos al microscopio, es decir, los tipos de hifas, micelios, conidióforos y las ramificaciones que presentan (**Gómez et al., 2014**).

Beauveria bassiana, como se observa en la figura 6, presenta conidióforos de 2 micras de diámetro con células conidiógenas que forman grupos de grandes tamaños (3 a 5 micras). Estas células conidiógenas a su vez, tienen ramificaciones formando raquis de 20 micras de longitud, los cuales sujetan a las conidias. Estas conidias se caracterizan por ser globosas y medir de 2 a 3 micras (**Cañedo, 2004**).



Figura 6. Morfología microscópica de *Beauveria bassiana*

Fuente: (Cañedo, 2004).

Paecilomyces fimosoroseus, como se observa en la figura 7, presenta conidióforos terminales de 100 micras de longitud. Las 15ialides se encuentran formando grupos de 3 a 6. Estas tienen una medida de 6 micras de largo. Las conidias son cilíndricas con los extremos redondos y miden de 3 a 5 micras por 2 micras (Cañedo, 2004).

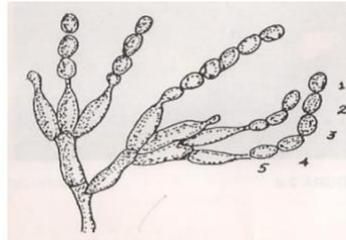


Figura 7. Morfología de *Paecilomyces fimosoroseus*

Fuente: (Frye, 2012).

Metarhizium anisopliae, como se observa en la figura 8, tiene conidióforos ramificados con 2 a 3 ramas por cada septo. El conidióforo mide en promedio 7 micras. Las 15ialides tienen forma cilíndrica, midiendo 10 micras de longitud. Las conidias son truncadas, cilíndricas y unicelulares las cuales se encuentran formando cadenas de color verdoso. Tienen una medida en promedio de 6.25 micras (Cañedo, Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos, 2004).



Figura 8. Morfología microscópica de *Metarhizium anisopliae*

Fuente: (Cañedo, 2004).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Caracterizar hongos entomopatógenos presentes en el suelo de diferentes zonas agrícolas de la provincia de Tungurahua.

1.2.2. Objetivos específicos

- Establecer un cultivo puro de *Galleria mellonella* a nivel de laboratorio.
- Aislar hongos entomopatógenos presentes en diferentes muestras de suelo.
- Caracterizar macro y microscópicamente los hongos entomopatógenos aislados.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Ninguna de las especies de hongos aisladas de las muestras de suelo es un hongo entomopatógeno.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Algunas de las especies de hongos aisladas de las muestras de suelo son hongos entomopatógenos

1.3.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.3.3.1. Variables dependientes

- Aislamiento de hongos entomopatógenos de muestras de suelo
- Caracterización macro y microscópica de microorganismos

1.3.3.2. Variables independientes

- Cambios ambientales que permitan un desarrollo óptimo
- La observación permitirá caracterizar a cada una de las colonias desarrolladas

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Localización

La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Empresa BIOSEBORGANICS CIA. LTDA., en el periodo noviembre 2020 – mayo 2021. La empresa se encuentra ubicada en la Av. Indoamérica km. 6 Sector El Pisque. Ambato – Ecuador.

2.2. Materiales

2.2.1. Material de laboratorio

- Algodón
- Atomizador
- Aza de punta
- Bandeja plástica
- Cajas 18ial de plástico
- Cajas 18ial de vidrio
- Cinta masking
- Criovial plástico
- Cubre objetos
- Jeringuilla
- Larvas de *Galleria mellonella*
- Ligas
- Lupa
- Marcador *sharpie permanente*
- Material de vidrio (GLASSCO)
- Mecheros de alcohol
- Micropipetas de 1000 μ l y 200 μ l

- Pala
- Palillos de madera pequeños
- Panal de abeja
- Panal de abeja
- Papel aluminio
- Papel calco transparente
- Parafilm
- Pinzas de acero
- Porta objetos
- Puntas plásticas para micropipeta 1000 μ l y 200 μ l
- Recipientes de plástico con tapa de forma rectangular (capacidad de 2 litros)
- Salvado de trigo
- Toallas absorbentes (Familia)

2.2.2. Reactivos

- Agua destilada
- Azul de Lactofenol al 10%
- Etanol 100% puro (LA CASA DEL QUÍMICO)
- Glicerol
- Medio PDA (Papa Dextrosa Agar) (39g/L)
- Rifampicina
- Sulfato de estreptomicina

2.2.3 Tecnológicos

- Autoclave
- Calefactor
- Cámara de flujo laminar (*ESCO*)
- Microscopio electrónico

2.3. Métodos

2.3.1. Población y Muestra

Se recolectó muestras de la rizosfera de cualquier tipo de cultivo comercial en las parroquias Pelileo, Quisapincha, Unamuncho y Santa Rosa, pertenecientes a la Provincia de Tungurahua. Aleatoriamente se muestreó el sitio de interés. Con la ayuda de una pala, se cavó a una profundidad de 20 cm de la capa superficial y una distancia de 20 – 50 cm del tallo. En este punto se homogeneizó la tierra, para tomar un kilogramo de muestra en fundas limpias de plástico rotuladas.

Luego de cada toma se limpió la pala con alcohol y una toalla absorbente, asegurando así la asepsia del proceso hasta su llegada al laboratorio. El almacenamiento se dio bajo condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Para la fase de caracterización de hongos entomopatógenos se utilizaron 22 cepas asiladas de los suelos mencionados en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos del lugar de recolección

Código de aislamiento	Procedencia de suelo	Cultivo agrícola
A1	Pelileo – TOA	Papa
A2	Pelileo – Hodon	Papa
A3	Pelileo – Michulsi	Papa
A4	Pelileo – Loka	Papa
A5	Pelileo – Mariana	Papa
A6	Pelileo – P.N.T.	Papa
A7	Santa Rosa – Misquilli	Maíz
A8	Santa Rosa – Misquilli	Habas
A9	Quisapincha – Putugleo	Césped
A10	Quisapincha – Palama	Habas
A11	Quisapincha – Ambayata	Césped
A12	Santa Rosa – El Quinche	Frutales

A13	Santa Rosa – Bellavista	Sin Cultivo
A14	Unamuncho – San Jorge	Tomate de árbol
A15	Unamuncho – San Pablo	Tomate de árbol
A16	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 1	Apio
A17	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 2	Tomate Riñón
A18	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 3	Tomate Riñón
A19	Unamuncho – San José	Tomate de Árbol
A20	Quisapincha – Palama	Arveja
A21	Quisapincha – Putugleo	Haba
A22	Quisapincha – Ambayata	Maíz
A23	Quisapincha – Ambatillo	Césped

2.3.2. Cultivo de *Galleria mellonella*

La primera pareja macho – hembra de este insecto en estado adulto fue provista por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Para iniciar el experimento, la pareja de *Galleria mellonella* se colocó en un recipiente plástico, el cual en su interior contenía un pedazo de panal de abeja y una dieta artificial (previamente esterilizada) a base de salvado de trigo, miel de abeja y glicerol. Además de esto, se pegó papel calco transparente en forma de abanico en una esquina, para poder visualizar los huevecillos. Para permitir la correcta provisión de oxígeno, se cortó un rectángulo en la tapa del recipiente, la cual se cubrió con una toalla absorbente. Finalmente, el recipiente se mantuvo en un cuarto a temperatura de 24 °C (Santos, y otros, 2016). El monitoreo de esta actividad fue diario para verificar que los insectos adultos sigan con vida, la disponibilidad de alimento, visualización de los huevecillos o larvas y cualquier novedad existente en el proceso. A los 38 días se seleccionó las larvas en estadio 5 las cuales fueron empleadas como trampa cebo en la multiplicación y detección *in vitro* de hongos entomopatógenos. Para mantener la siguiente generación, se colocaba 5 pupas y 10 larvas en estadio avanzado en un recipiente limpio y desinfectado con alcohol, repitiendo los puntos mencionados.

2.3.3. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos

Se desarrolló por un proceso selectivo mediante la técnica de trampa cebo. Se requirió de 20 larvas de *Galleria mellonella* en estadio 5 por cada 500 gramos de muestra de suelo, las cuales se depositaron en un recipiente plástico para que se adhieran las esporas a su cutícula. Se monitoreó diariamente la presencia de la infección causada por cualquier hongo o bacteria, para ello las muestras se trasvasaron a un recipiente hondo, el cual facilitó la búsqueda de las larvas en la tierra, hasta que todas hayan muerto, sea por el hongo, bacterias o cualquier otra causa.

Una vez obtenidas las larvas muertas, se realizó un proceso de desinfección para remover la mayor cantidad de material superficial que se encuentre adherido. Primero con la ayuda de pinzas estériles, las larvas se sumergieron en agua de llave estéril por 1 minuto, este paso se realizó por duplicado en un vaso de precipitados diferente. Posteriormente, se pasó el material a etanol al 70 % por 10 segundos, seguido por un doble lavado en agua de llave estéril por 1 minuto. Las muestras lavadas se colocaron en cámara húmeda. Cada cámara húmeda constó de tres – cuatro larvas en una caja 22iali y en el centro algodón humedecido con agua de llave estéril. A continuación se selló con parafilm los contornos de la caja 22iali y se cubrió con papel aluminio. El ciclo de cada experimento de aislamiento por lo general tomó 7-9 días a temperatura ambiente.

Se aisló y purificó los cultivos cuando se observó el crecimiento de los hongos sobre las larvas. Con ayuda del asa en punta se tomó parte del micelio aéreo y se colocó en una sección de una caja bipetri que contenía PDA (39 g/L) + Rifampicina y Sulfato de Estreptomicina. Las cajas fueron incubadas por 7 días a 26 °C. El proceso fue repetido hasta observar que en la superficie del medio sintético crecía sólo un tipo morfológico de hongo (**Cañedo & Ames, 2004**). En total se obtuvo 22 aislamientos de hongos entomopatógenos.

2.3.4. Almacenamiento y conservación de cultivos puros de hongos entomopatógenos.

La conservación a largo plazo de los 22 hongos entomopatógenos aislados se realizó por la transferencia del material de cada cultivo puro hacia un criovial debidamente codificado con 1600 µl de solución de glicerol 20% (v/v), a -20 °C. También se realizó suspensiones celulares en tubos ependorf de agua de llave conservados a 4 °C, los cuales sirvieron para la fase de caracterización posterior.

2.3.5. Caracterización macroscópica de los aislamientos

A partir del tubo ependorf de agua de llave se colocó 5 µL en el centro de una caja Petri con PDA, la cual fue incubada por 21 días a temperatura de 27 °C. Se evaluó semanalmente el desarrollo y morfología del hongo. Los 7 días iniciales sirvieron para conocer el crecimiento en cuanto a su color, la forma del borde y pigmentación que generó en el medio. En la segunda semana se informó el color de su esporulación.

2.2.6. Caracterización microscópica de los aislamientos

Se preparó una muestra pura de cada cultivo de hongo entomopatógeno empleando un asa de punta previamente estéril. Se consideró el centro de la caja como mejor punto por la probabilidad de disponer una estructura reproductiva desarrollada. Una muestra de micelio se depositó en una pequeña gota de lactofenol (1%) sobre un portaobjetos limpio, y finalmente se colocó el cubreobjetos. Con la ayuda del microscopio se identificó la estructura de cada hongo, clasificándolos preliminarmente por el género, gracias al uso de descripciones y claves taxonómicas (**Berumen, 2017**).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Establecimiento del cultivo puro de *Galleria mellonella* a nivel de laboratorio.

Con la finalidad de aislar hongos entomopatógenos se implementó la cría de *G. mellonella* en condiciones de laboratorio, para lo cual se colocó un pedazo de panal de abeja y una dieta artificial a base de salvado de trigo (como fuente de proteína, almidón y minerales), miel de abeja (como una rica fuente de carbohidratos principalmente de glucosa, fructosa y en menores cantidades aminoácidos, minerales y vitaminas) (Ulloa, Mondragón, Rodríguez, Reséndiz, & Ulloa, 2010), y glicerol (como fuente de carbono). Esta dieta es ideal para el crecimiento de dicho insecto ya que provee macro y micronutrientes esenciales para su desarrollo (Galán, 2012). Además, no se realizó ningún cambio en cuanto a la cantidad de ingredientes utilizados, ya que la mezcla empleada no afectó el ciclo biológico normal del insecto y por consiguiente resultó adecuado para el crecimiento y reproducción de *G. mellonella*. También se colocó un abanico de papel calco transparente con la finalidad de que las hembras ovopositen y finalmente mueran, dejando su nueva generación para mantener el ensayo.

En la Figura 9, se puede observar, en la primera imagen la dieta artificial, junto con el panal y las larvas. En la segunda imagen de igual forma se encuentra la dieta artificial; sin embargo, se observa la presencia de los adultos *G. mellonella* los cuales ya han puesto huevecillos. Finalmente, en la tercera imagen, la dieta ha sido consumida casi en su totalidad, por lo cual se inició con la búsqueda de las larvas. Además, se observa que se formó una especie de seda, la cual se produce cuando las larvas de *Galleria* pasan a la etapa de pupa, ya que se cubre con ella. En el entorno natural, cuando *Galleria* infesta panales de abejas, el insecto se desprenderá de la seda al finalizar la etapa de pupa lo cual podría afectar a las abejas ya que se acumulará e impedirá su salida del panal, puesto que pueden llegar a cubrir gran parte de él (Zapata, Ceballos, Céspedes, Alarcon, & Leyton, 2015).



Figura 9. A) larvas de *Galleria mellonella* con dieta artificial y panal, b) presencia de adultos y huevecillos, c) dieta casi consumida y presencia de seda

La cría de *G. mellonella* inició con 5 adultos macho y 5 adultos hembra los cuales, como se observa en la figura 10, fueron colocados en 5 recipientes, 10 por cada recipiente. Junto a los insectos se colocó panal de abejas, agua y dieta artificial. El proceso de cría se mantuvo por 3 generaciones, obteniéndose un total de 250 larvas en cada generación. De estas, 200 sirvieron para detectar y multiplicar *in vivo* los hongos entomopatógenos, mientras que los 50 restantes se utilizaron para continuar con el proceso de crianza de las próximas generaciones. Las larvas de *G. mellonella* son comúnmente utilizadas a nivel de laboratorio para el aislamiento de hongos entomopatógenos, debido a que es una especie muy susceptible para infectarse con hongos. Además, es una especie de rápido desarrollo y sencillo mantenimiento, lo cual ofrece un proceso de aislamiento de bajo costo e idóneo en términos técnicos (Archuleta, García, & Gaxiola, 2009).



Figura 10. Ejemplares adultos de *Galleria mellonella* junto con un panal de abejas.

Se observó que el ciclo completo de *G. mellonella* tarda 50 – 60 días a temperaturas de 27 – 31 °C. Por otra parte, tomó alrededor de 10 días para que se dé el paso de huevo a larva, 19 – 25 días para que se forme la pupa, y en 15 -18 días adicionales se evidenció el adulto nuevamente. Este ciclo se puede observar en la Figura 11, en donde en a) se observa a *G. mellonella* en estado larval, b) la pre-pupa, en c) la pupa y finalmente en d) en estado adulto. Estos resultados son similares y acordes al estudio realizado por Realpe, Bustillo, & López

(2007), en donde identificó que el ciclo de vida de *G. mellonella* es de 62 días a 30°C, en promedio, teniendo una duración de 30.4 días en estado larvario, y de 14.2 a 17.2 días para que se forme el adulto.

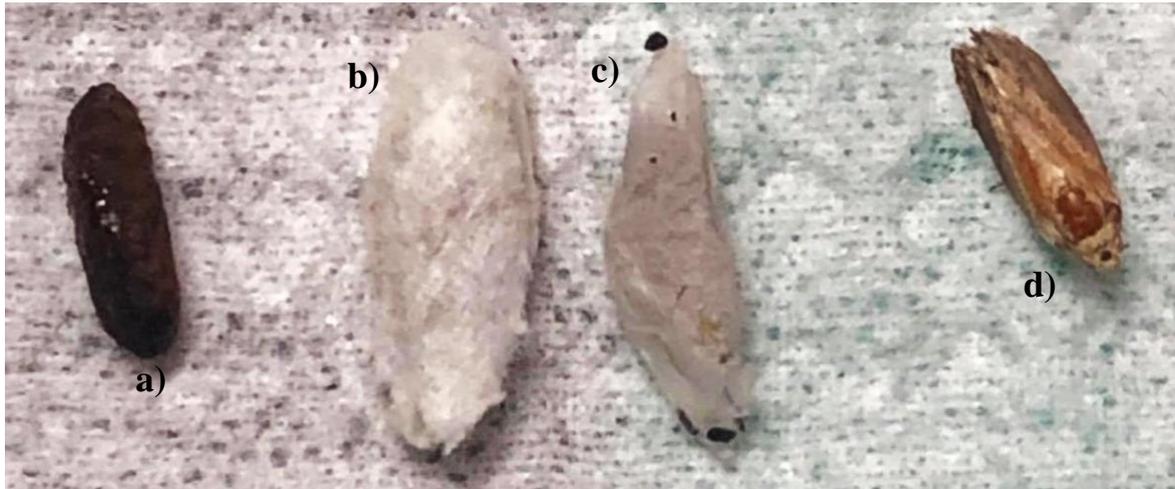


Figura 11. Ciclo biológico de *Galleria mellonella*, pasando por a) larva, b) pre-pupa, c) pupa y d) adulto.

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos se emplearon las larvas en el quinto estadio, debido a que allí estas tuvieron un tamaño óptimo para el ensayo. Hasta llegar a dicho estadio se colocó agua en un espacio del panal, con la ayuda de una jeringuilla, dos veces por semana. Sin embargo, se presentaron inconvenientes cuando se colocaba demasiada agua puesto que empezaron a crecer hongos ambientales, por lo cual se desechó el contenido de los recipientes contaminados. Esto se debe a que *G. mellonella* es altamente susceptible a infectarse con hongos, especialmente cuando se encuentra en condiciones de elevada humedad. Además, para que se produzca el desarrollo de una polilla grande, es necesario que se encuentre a una humedad relativa de 75 a 85%, en caso de que sea superior, el agua estará condensada provocando la aparición de hongos que ocasionen la muerte de dichas larvas (Rodríguez, 2015).

3.1.2. Muestreo en las zonas agrícolas de Tungurahua

Se recolectaron muestras de suelo en distintos sectores agrícolas pertenecientes a la Provincia de Tungurahua. Estos fueron en el Cantón Pelileo, y en las Parroquias rurales de Ambato: Quisapincha, Unamuncho y Santa Rosa. Se tomó un kilogramo de cada muestra que fue colocado en fundas estériles plásticas y llevadas al laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Empresa BIOSEBORGANICS CIA. LTDA ubicado en el sector El Pisque, en el km 6 de la avenida Indoamérica (Figura 12)., para proceder a realizar el aislamiento y purificación de estas. En total se recolectaron 23 muestras, siendo 6 de Pelileo, 4 de Santa Rosa, 7 de Quisapincha y 6 de Unamuncho, la localización de dichas muestras se observa en la Figura 13, en donde se señala cada código de muestra con su respectiva ubicación dentro de la provincia de Tungurahua.

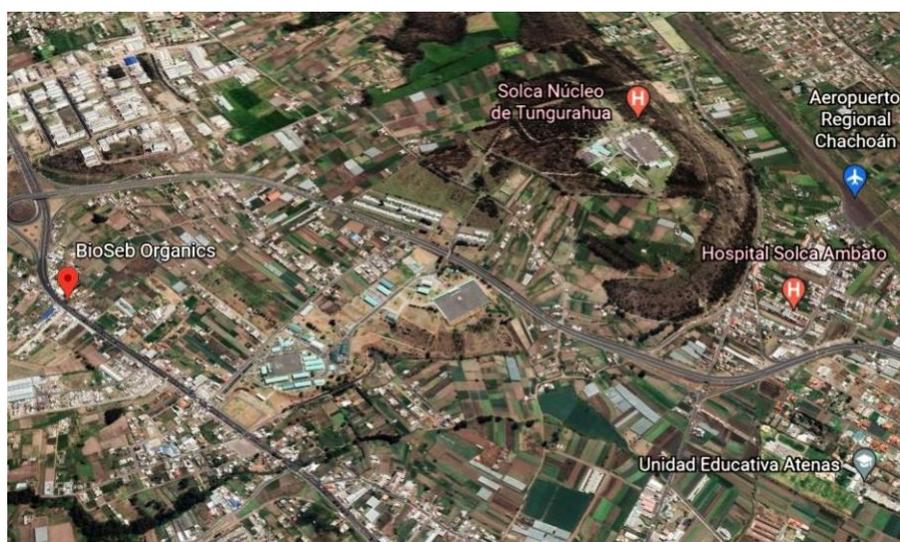


Figura 12. Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Empresa BIOSEBORGANICS CIA. LTDA

Fuente: (Google-Earth, 2021).

3.1.3. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos presentes en diferentes muestras de suelo.

Como se mencionó anteriormente, para el aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos se seleccionó las larvas de *G. mellonella* que se encontraban en el estadio 5 (Figura 14^a) debido a que tenían un tamaño adecuado. El crecimiento de las larvas hasta el estadio 5 tomó 38 días. Se conoce que el crecimiento de esta larva pasa por siete etapas, ocurriendo la mayor parte del crecimiento en el quinto y sexto estadio (Unsal, Ozparlak, & Aktumese, 2004). A continuación, las muestras de suelo recolectadas en las distintas localidades de la Provincia de Tungurahua fueron tamizadas y colocadas junto con las larvas en un recipiente plástico (Figura 14B). Se monitoreó diariamente con la finalidad de identificar la muerte de las larvas debido a contaminación por hongos, bacterias o cualquier otra causa. Una vez obtenidas las larvas muertas (Figura 14C) se realizó un proceso de desinfección para remover la mayor cantidad de material superficial que se encontraba adherido, para lo cual se utilizó agua de llave estéril y etanol al 70% (Figura 14D). Una vez desinfectadas las larvas, se las colocó en cajas 30iali con algodón humedecido en el centro, sellada con parafilm los contornos y cubierta con papel aluminio, se dejó de 7-9 días a temperatura ambiente. Al observar el crecimiento de hongos sobre las larvas (Figura 14E) se las aisló en cajas 30iali con medio PDA (39 g/L). Este es un medio ampliamente utilizado en el aislamiento de hongos, especialmente de hongos que parasitan insectos, ya que los hongos crecen y esporulan adecuadamente (Cañedo & Ames, 2004). Se añadió Rifampicina al medio de cultivo como antibiótico para impedir el crecimiento de bacterias en el medio, ya que esta inhibirá la formación del ARN bacteriano impidiendo su formación (Egas & Tinajero, 2016). Además, el medio de cultivo fue suplementado con Sulfato de Estreptomicina que igualmente es un antibiótico que inhibe el crecimiento de bacterias en el medio. Las muestras se incubaron por 7 días a 26 °C, y posterior a ello se repitió el proceso hasta obtener cultivos de un tipo morfológico de hongo en el medio (Figura 14F). Todo este proceso de aislamiento se observa en la Figura 14, en donde se encuentra el procedimiento resultante en orden secuencial.



Figura 14. Aislamiento y purificación de hongos entomopatógenos A. Larvas en el quinto estadio, B. Muestras de suelo tamizadas y colocadas con larvas, C. Larvas muertas, D. Desinfección de larvas muertas, E. Crecimiento de hongos, F. Purificación de hongos entomopatógenos

De las 23 muestras de suelo recolectadas, el 56.52% dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de hongos entomopatógenos, como se observa en la Tabla 6. Este porcentaje se debe a que se desechó varios recipientes en los que las larvas de *G. mellonella* presentaron crecimiento de bacterias u hongos no entomopatógenos. Como se explicó anteriormente, esto se debe a que esta polilla es altamente susceptible a infectarse con hongos, incluyendo hongos no entomopatógenos, especialmente cuando se encuentra en condiciones altas de humedad (Rodríguez, 2015). Sin embargo, a pesar de ello, los resultados obtenidos fueron bastante buenos, ya que frecuentemente hasta de un 10% del total de muestras de suelo recolectadas permiten aislar hongos entomopatógenos. La efectividad del método de aislamiento tiene gran influencia de las condiciones de temperatura y humedad de los sitios de muestreo, de los cuales depende estrictamente el crecimiento de los hongos entomopatógenos. Se conoce que *Entomophthora sp*, *Hirsurtella sp*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces sp* y *Metarhizium anisopliae*, necesitan generalmente una temperatura menor a 25°C y humedad relativa mayor o igual al 80% para desarrollarse (Carbonero & Córdova, 2014). A esto se añade el tipo de cultivo del cual se toman las muestras de suelo, ya que mientras las muestras colectadas sean distintos tipos, existirá mayor variación y diversidad en cuanto a las especies de hongos presentes.

Tabla 6. Géneros de hongos aislados de las diferentes muestras de suelo

Código de muestra	Procedencia de suelo	Aislamiento
A1	Pelileo – Toa	<i>Beauveria sp.</i> , <i>Metarhizium sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i>
A2	Pelileo – Hodon	<i>Beauveria sp.</i> , <i>Metarhizium sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i>
A3	Pelileo – Michulsi	Negativo
A4	Pelileo – Loka	<i>Beauveria sp.</i>
A5	Pelileo – Mariana	Negativo
A6	Pelileo – P.N.T.	<i>Beauveria sp.</i> , <i>Metarhizium sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i>
A7	Santa Rosa – Misquilli	Negativo
A8	Santa Rosa – Misquilli	<i>Beauveria sp.</i>

A9	Quisapincha – Putugleo	<i>Beauveria sp., Metarhizium sp., Paecilomyces sp.</i>
A10	Quisapincha – Palama	Negativo
A11	Quisapincha – Ambayata	Negativo
A12	Santa Rosa – El Quinche	Negativo
A13	Santa Rosa – Bellavista	<i>Beauveria sp., Metarhizium sp.,</i>
A14	Unamuncho – San Jorge	<i>Metarhizium sp. Paecilomyces sp.</i>
A15	Unamuncho – San Pablo	Negativo
A16	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 1	Negativo
A17	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 2	Negativo
A18	Unamuncho, San Pablo – Invernadero 3	<i>Metarhizium sp</i>
A19	Unamuncho – San José	<i>Metarhizium sp.</i>
A20	Quisapincha – Palama	Negativo
A21	Quisapincha – Putugleo	<i>Metarhizium sp.</i>
A22	Quisapincha – Ambayata	Negativo
A23	Quisapincha – Ambatillo	<i>Metarhizium sp.</i>

En el estudio realizado por **Galán (2012)**, que tuvo por objetivo identificar hongos entomopatógenos de distintas zonas cítrícolas de México, se determinó que de 128 muestras recolectadas de suelo, el 24% dio positivo a la presencia de hongos entomopatógenos pertenecientes a *Metarhizium sp*, *Isaria sp* y *Beauveria sp*. Contrario a ello, en otro estudio similar se obtuvo aislamientos de hongos entomopatógenos en el 50% de un total de 30 muestras de suelo que fueron recolectadas en Ica, Perú, (**Carbonero & Córdova, 2014**), lo cual es similar al porcentaje obtenido en el presente estudio.

En el presente estudio, con base a las características macroscópicas de los cultivos, se determinó que los hongos entomopatógenos aislados pertenecen a los géneros: *Metarhizium sp* (Figura 15^a), característico por presentar una coloración verde olivo oscuro; *Beauveria spp* (Figura 15B), con una textura algodonosa blanca, y *Paecilomyces spp* (Figura 15C), con una coloración marrón grisácea. Cabe mencionar

que también se observó la presencia de larvas de *G. mellonella* contaminadas con bacterias y hongos ambientales, pero estas fueron desechadas (Figura 16).

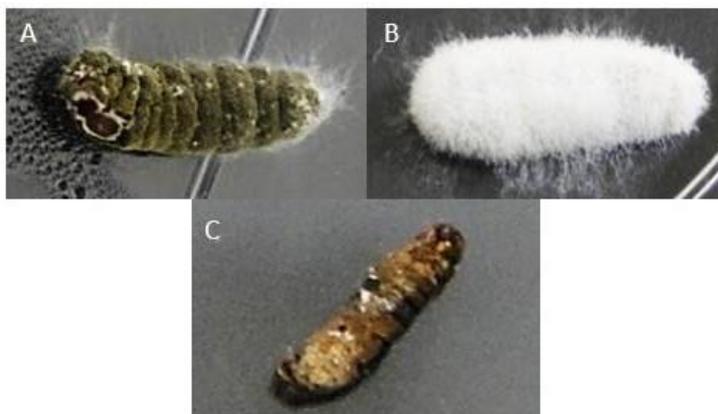


Figura 15. *Galleria mellonella* infectada por hongos entomopatógenos, A. *Metarhizium sp.*, B. *Beauveria sp.*, C. *Paecilomyces sp.*



Figura 16. Contaminación de *Galleria mellonella* por hongos ambientales y bacterias (muestra de suelo A11)

Del total de hongos entomopatógenos aislados de las muestras de suelo recolectadas que dieron resultados positivos, el 45.45% pertenece a *Metarhizium spp.*, el 31.82% a *Beauveria spp.*, y el 22.73% restante, pertenece a *Paecilomyces spp.*, como se observa en la figura 17.

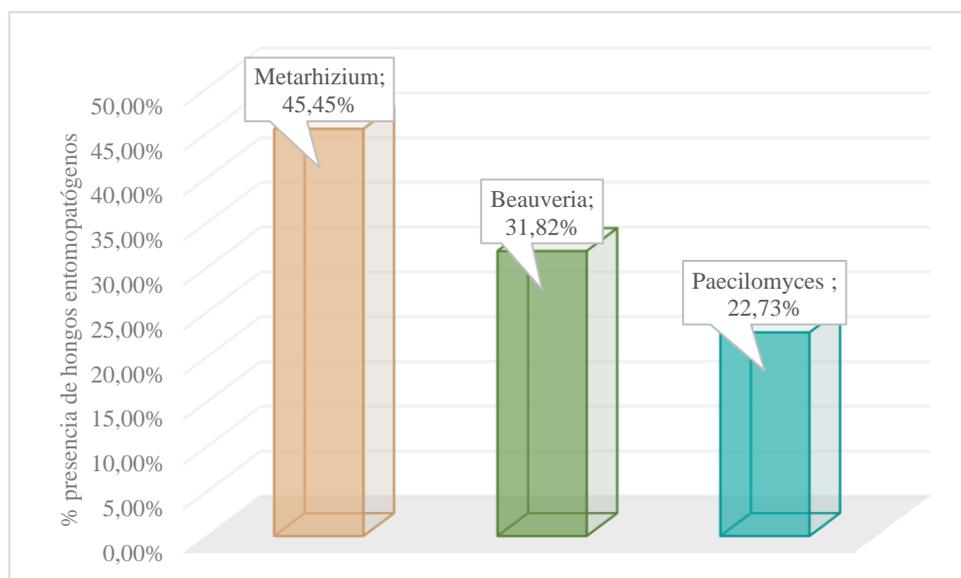


Figura 17. Porcentaje de resultados positivos a la presencia de hongos entomopatígenos del total de muestras de suelo recolectadas

En la tabla 7 se muestra un resumen de las cepas aisladas de los tres géneros de hongos entomopatígenos, se encontró 4 cepas del hongo entomopatígeno *Beauveria spp* en Pelileo, 2 cepas en Santa Rosa, 1 Quisapincha, *Metarhizium spp*, se encontró en Pelileo 3 cepas, Santa Rosa 1 cepa, Quisapincha 3 cepas y Unamuncho 3, finalmente de *Paecilomyces spp* se encontró 3 cepas en Pelileo, 1 cepa en Quisapincha y 1 cepa en Unamuncho. En los Anexos 7, 8 y 9, se encuentran las tablas resumen del aislamiento de cada hongo entomopatígeno, junto con la clave de aislamiento que se colocó a cada cepa.

Tabla 7. Resumen de cepas aisladas de tres géneros de hongos entomopatígenos encontradas en diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua.

Zona Agrícola	Número de muestras	<i>Beauveria spp.</i>	<i>Metarhizium spp.</i>	<i>Paecilomyces spp.</i>
Pelileo	6	4	3	3
Santa Rosa	4	2	1	0
Quisapincha	7	1	3	1
Unamuncho	6	0	3	1
TOTAL	23	7	10	5

El porcentaje de frecuencia de aislamiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium spp* fue el más alto, pero muy cercano al porcentaje obtenido para *Beauveria spp*. Esto se debe a que ambos géneros tienen una amplia distribución en la naturaleza y son considerados como dos géneros de fácil aislamiento y multiplicación en laboratorio. Además, toleran mucho mejor las variaciones de temperatura y humedad que otros hongos entomopatógenos (Elósegui, Jiménez, & Carr, 2006). En el estudio realizado por Galán (2012), el mayor porcentaje de aislamientos correspondió a *Beauveria spp*, seguido por *Isaria spp* y finalmente por *Metarhizium spp*. Estos resultados fueron similares a lo observado por Hernández, Espíndola, Villalobos, García, & Peña (2011), en donde se aisló un mayor porcentaje de *Beauveria bassiana*, seguido de *Metarhizium anisopliae* y finalmente *Paecilomyces sp*. La variación observada en el presente estudio puede deberse a que *Beauveria spp* se caracteriza por obtenerse mayoritariamente en plantaciones de café, ya que ataca insectos que se encuentran principalmente en cafetales (Galán, 2012). Por lo tanto, las muestras pudieron favorecer de cierta forma la presencia *Metarhizium spp* con respecto a *Beauveria spp*, ya estas no fueron recolectadas de dichos cultivos, sin embargo. Sin embargo, la variación observada no es significativa.

Paecilomyces spp, se aisló en menor porcentaje con respecto a *Metarhizium spp* y *Beauveria spp*, presumiblemente debido a que este hongo entomopatógeno se encuentra mayoritariamente en suelos tropicales y subtropicales. Además, para la producción de este hongo hay que tener en cuenta varios aspectos a los que es altamente susceptible. Uno de ellos, y el más importante, se relaciona a los sustratos que son utilizados, ya que la concentración de nitrógeno que suplementada al medio de cultivo afecta directamente al desarrollo del micelio. De forma similar, la relación C:N que disponga el microorganismo varían dependiendo de la especie. Por ejemplo, para *Paecilomyces lilacinus* se demostró que necesita de una concentración de carbono de 12 g/L y una relación de 20:1 de C:N; sin embargo se observó que una cepa distinta requirió de una concentración de carbono de 8 g/L y una relación C:N de 10:1 para su desarrollo. La importancia del adecuado suministro de C:N también afecta la capacidad de *Paecilomyces* para suprimir plagas (Samaniego, 2015). Además de los factores nutricionales, la temperatura óptima de cultivo es otro elemento importante para que *Paecilomyces* crezca apropiadamente. Se recomienda una temperatura 28 °C para el

crecimiento del hongo y de 24°C para que se dé una esporulación adecuada (Carr, Elósegui, & Bel, 2003).

En el presente estudio no se logró aislar otras especies de hongos entomopatógenos como aquellas pertenecientes a los géneros *Entomophthora*, *Hirsurtella*, *Verticillium*, o *Lecanicillium*, debido posiblemente al muestreo, ya que el número de muestras tomadas fue reducido. Además, cada especie requiere de factores ambientales ideales para su desarrollo como son el brillo solar, la temperatura y la humedad. Por otra parte, los moradores de la zona o dueños de los sitios de muestreo pudieron haber colocado funguicidas sobre los cultivos, lo que disminuye la probabilidad de identificar una mayor variedad de hongos entomopatógenos (Galán, 2012).

3.1.4. Caracterización de los hongos entomopatógenos aislados

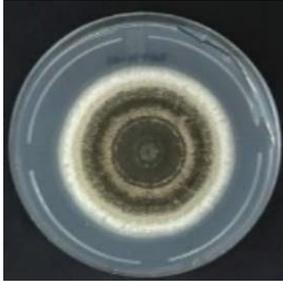
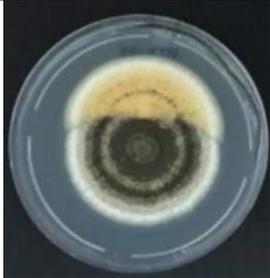
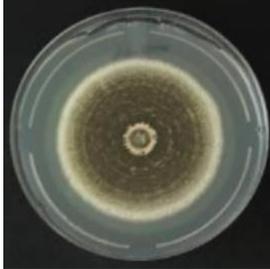
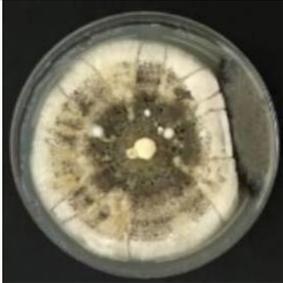
3.1.4.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica de los hongos entomopatógenos aislados se realizó en base al color de la colonia, forma de su borde y pigmentación generada en el medio por el micelio de sustrato, como se observa en la tabla 8, en donde se describen todos estos parámetros junto con la clave establecida a cada cepa.

Tabla 8. Principales características macroscópicas de aislados de hongos entomopatógenos obtenidos.

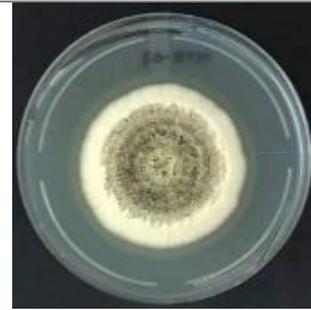
Clave de Aislado	Descripción	Imagen
BBA-01	Colonia blanca y polvorienta inicial. Con el tiempo mantiene su característica inicial. Micelio irregular. Color reverso amarillo intenso.	

BBA-02	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, con el tiempo se torna algodonosa intensa. Micelio irregular. Color reverso amarillo ligero.</p>	
BBA-03	<p>Colonia blanca y algodonosa, con el tiempo se torna algodonosa intensa. Micelio irregular. Color reverso amarillo ligero.</p>	
BBA-04	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, con el tiempo se torna algodonosa. Micelio regular. Color reverso amarillo intenso.</p>	
BBA-05	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, con el tiempo se torna ligeramente algodonosa. Micelio regular. Color reverso amarillo intenso.</p>	
BBA-06	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, con el tiempo se torna ligeramente algodonosa. Poco micelio y regular. Color reverso amarillo intenso.</p>	
BBA-07	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, con el tiempo se torna algodonosa. Micelio irregular. Color reverso amarillo intenso.</p>	

MTH-01	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, se torna amarilla verdosa y al final predomina el verde olivo oscuro. En la zona central presenta micelio blanquecino de forma regular. Color reverso amarillo claro.</p>	
MTH-02	<p>Colonia blanca y algodonosa intensa, se torna amarilla verdosa. Micelio inicial abundante, blanquecino e irregular. Color reverso verde claro.</p>	
MTH-03	<p>Colonia blanca y polvorienta inicial, se torna verdosa y verde oliva al final. Micelio blanquecino regular. Color reverso amarillo.</p>	
MTH-04	<p>Colonia blanca algodonosa, se torna amarilla verdosa y al final verde oliva. Micelio blanquecino regular. Reverso color amarillo intenso.</p>	
MTH-05	<p>Colonia muy algodonosa, color blanca total y luego verde central. Micelio irregular blanco. Color reverso amarillo intenso.</p>	
MTH-06	<p>Colonia muy algodonosa, color blanca total y luego verde central. Micelio irregular blanco. Color reverso amarillo intenso.</p>	

MTH-07

Colonia polvorienta, color blanca total y luego verde central, esporulación lenta. Micelio regular blanco. Color reverso amarillo intenso.



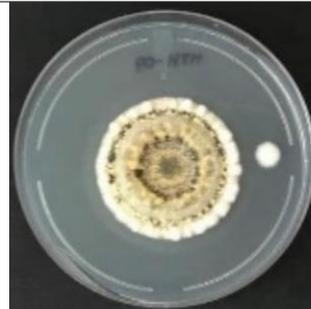
MTH-08

Colonia muy algodonosa, color blanca total y luego verde central. Micelio irregular blanco abundante. Color reverso amarillo.



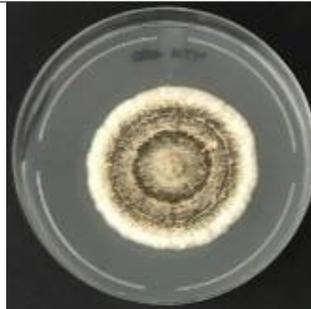
MTH-09

Colonia muy algodonosa, color blanca total y luego verde central. Micelio irregular amarillento. Color reverso amarillo.



MTH-10

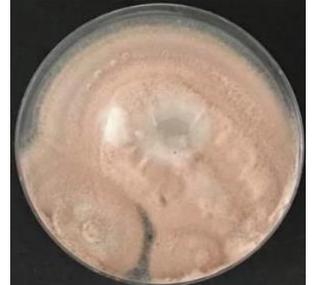
Colonia muy algodonosa, color blanca total y luego verde central. Micelio regular blanco. Color reverso amarillo intenso.



PCS-01

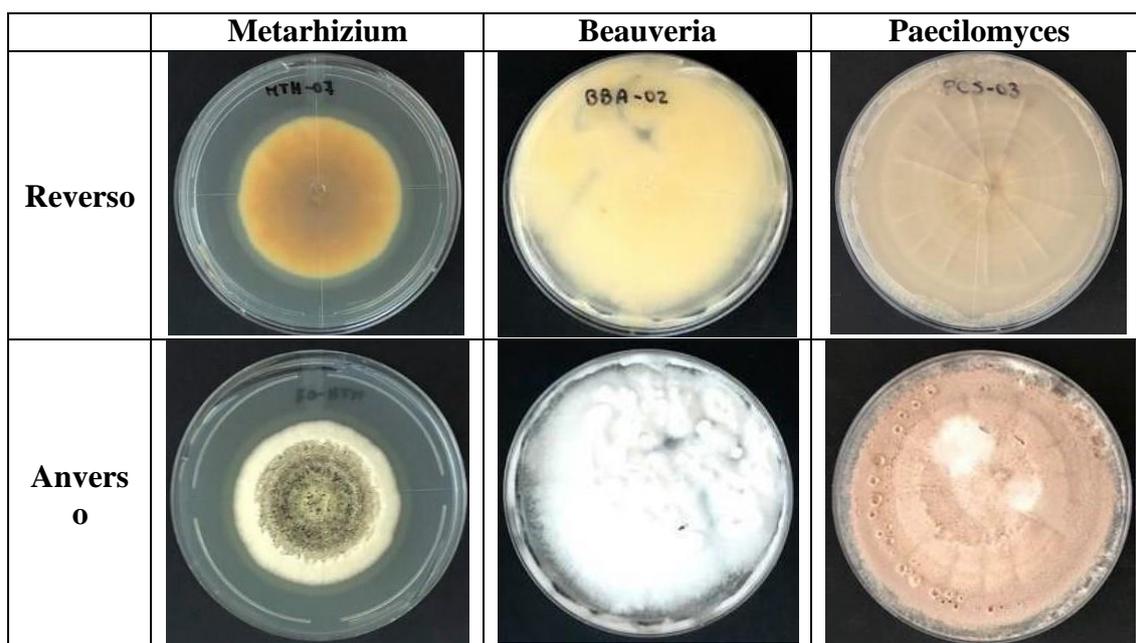
Colonia inicial algodonosa, color violeta claro y al final marrón grisáceo con micelio irregular. Color reverso crema.



PCS-02	<p>Colonia inicial algodonosa, color violeta claro y al final violeta grisáceo con micelio irregular. Color reverso crema.</p>	
PCS-03	<p>Colonia inicial algodonosa, color violeta claro y al final marrón grisáceo con micelio irregular. Color reverso crema.</p>	
PCS-04	<p>Colonia inicial algodonosa, color violeta claro y al final gris con micelio irregular. Color reverso crema amarillento.</p>	
PCS-05	<p>Colonia inicial algodonosa, color violeta claro y al final marrón grisáceo con micelio irregular. Color reverso crema.</p>	

En cuanto a la caracterización macroscópica de *Beauveria* se observó que existió variaciones entre colonias; sin embargo, estas no son significativas. Por ejemplo, BBA-01 presenta una colonia blanca y polvorienta inicial, la cual se con el tiempo, un micelio irregular y un color amarillo intenso al reverso. Por otro lado, esta característica varía en las colonias BBA-02, BBA-04, BBA-05, BBA-06 y BBA-07, las cuales inicialmente presentan una colonia blanca y polvorienta, que con el tiempo se torna algodonosa intensa. En cambio, BBA-03 presenta inicialmente una textura algodonosa convirtiéndose con el tiempo en algodonosa intensa. Otra variación observada entre colonias es la coloración del anverso el cual varía de amarillo intenso a ligero (Tabla 9).

Tabla 9. Hongos entomopatógenos aislados en la semana 3



Estas características coinciden con las establecidas por **García, Capello, Leshner, & Molina (2011)**, en cuanto a la textura blanca lanosa o polvorienta, debido a que este hongo entomopatógeno posee gran cantidad de conidios lo cual le da dicha textura. Lo mismo afirma **Castillo, et al. (2012)** a través de la caracterización que realizó del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* aislada de Trujillo – Venezuela, en donde establece su textura polvorienta, cambiando a algodonosa, de color blanco y con una coloración amarillenta en la parte posterior. Este color característico de *Beauveria* se observa en la tabla 9.

Metarhizium, por su parte, también presentó variaciones entre cepas. MTH-01 y MTH-03 presentaron una textura blanca y polvorienta inicial, mientras que MTH-02, MTH-04, MTH-05, MTH-06, MTH-08 y MTH-09 mostraron una textura blanca y algodonosa inicial. MTH-07 presenta una textura polvorienta. A las 3 semanas de cultivo, las 4 primeras colonias presentan una coloración verde olivo oscuro, mientras que las demás colonias una coloración verde en el centro. En cuanto a la forma del borde del micelio, MTH-01, MTH-03, MTH-04, MTH-07 y MTH-10, tienen forma regular, y las demás cepas micelio en forma irregular. El reverso de las cepas varía de coloración entre amarillo y verdoso (Tabla 9).

Estos datos presentan semejanza con respecto a lo establecido por **García, Capello, Leshner, & Molina (2011)**, en donde *Metarhizium anisopliae* muestra una coloración variable de verde oscuro a verde olivo debido a que los conidios maduran. Además, estos tienen un aspecto polvoriento y algodonoso el cual varía entre cepas. De igual forma, **Toscano & Yucailla (2018)** reportaron aislamientos *Metarhizium* de contextura similar, con bordes del micelio que varían entre regulares e irregulares, presentando una coloración amarillenta al reverso de la caja petri.

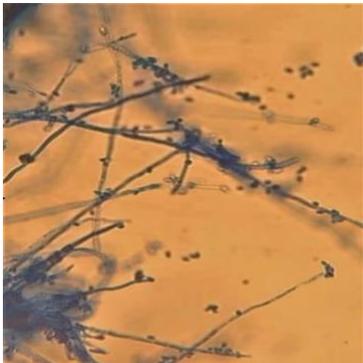
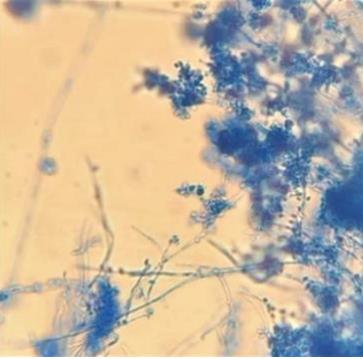
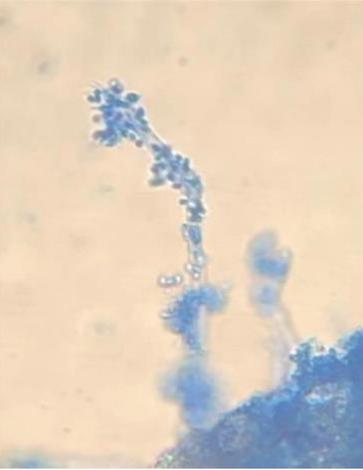
Paecilomyces presentó características similares entre todas las cepas identificadas, teniendo una textura inicial algodonosa la cual es de color violeta claro, rosáceo, éste va cambiando a una tonalidad marrón grisáceo a las 3 semanas, presenta un micelio irregular y color crema al reverso de la caja 43ial (Tabla 12). Esto está acorde a las características presentadas por **Sánchez (2013)**, quien identificó a *Paecilomyces fumosoroseus* con una textura algodonosa de color rosado claro y micelios irregulares. Por otro lado, **González, Rodríguez, & Rivera (2016)** establecieron las características morfológicas de *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*, los cuales varían solamente en la coloración lila, y crema respectivamente, con un crecimiento irregular y expandido.

3.1.4.2. Caracterización microscópica

En la tabla 10 se describen las principales características microscópicas observadas para los hongos entomopatógenos aislados y purificados, junto con la imagen de cada cepa. *Beauveria* por su parte, no presenta variaciones significativas entre cepas. Se observaron células conidiogénicas típicas de la especie, y conidios sub globosos-elipsoidales, lo cual coincide con lo descrito para *Beauveria bassiana*, microorganismo que suele presentar conidios elipsoides, sub globosos o globosos, células conidiógenas que presentan bases globosas, e hifas septadas, hialinas y ramificadas (**Contreras & Bustillo, 2019**). **García, Capello, Leshner, & Molina (2011)**, también describieron las características microscópicas de *Beauveria bassiana*, presentando fialides sub-globosas formando raquis en zigzag, células conidiógenas agrupándose irregularmente en racimos, e hifas lisas, cenocíticas. *B. bassiana* se diferencia de otras especies *Beuveria* debido a la forma

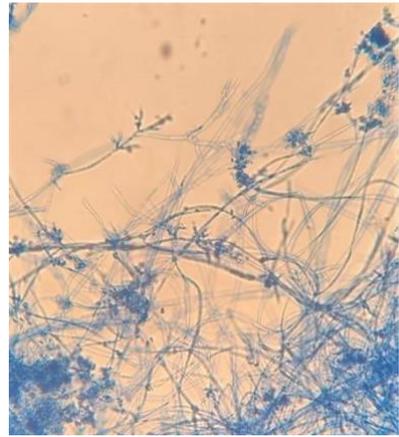
esférica y globosa de las conidias (Castillo, *et al*, 2012), por lo cual se sugiere que los hongos entomopatógenos aislados podrían pertenecer a *Beauveria bassiana*; sin embargo, es necesario realizar una caracterización molecular posterior para identificarlo adecuadamente.

Tabla 10. Principales características microscópicas de aislados de hongos entomopatógenos.

Clave de Aislado	Descripción	Imagen
BBA-01	Célula conidiogénica típica de la especie, conidios sub globosos-elipsoidales, hifas ramificadas.	
BBA-02	Célula conidiogénica típica de la especie, conidios sub globosos-elipsoidales, hifas ramificadas.	
BBA-03	Célula conidiogénica típica de la especie, conidios sub globosos-elipsoidales, hifas ramificadas.	

BBA-04

Célula conidiogénica típica de la especie, conidios sub globosos-elipsoidales, hifas ramificadas.



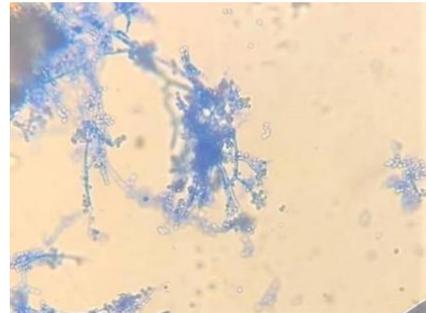
BBA-05

Célula conidiogénica típica de la especie, conidios sub globosos-elipsoidales, hifas ramificadas.



BBA-06

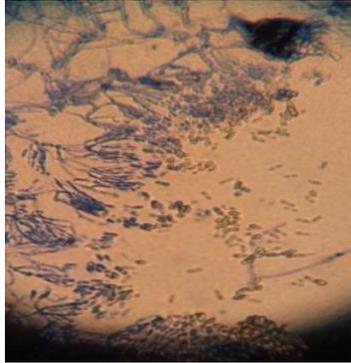
Célula conidiogénica típica de la especie, conidios subglobosos-elipsoidales, hifas ramificadas.



BBA-07

Célula conidiogénica típica de la especie, conidios subglobosos-elipsoidales, hifas ramificadas.



MTH-01	<p>Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.</p>	
MTH-02	<p>Conidióforos ramificados en forma de candelabro con dos o tres ramas cada uno. Conidios cilíndricos-elipsoidales formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.</p>	
MTH-03	<p>Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.</p>	
MTH-04	<p>Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.</p>	
MTH-05	<p>Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.</p>	

MTH-06

Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.



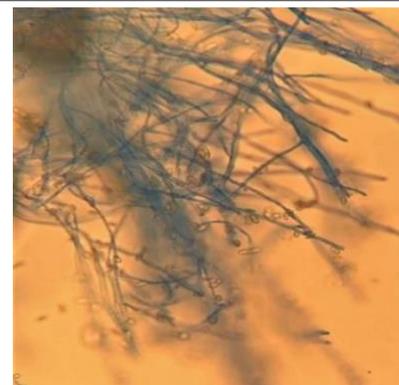
MTH-07

Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.



MTH-08

Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.



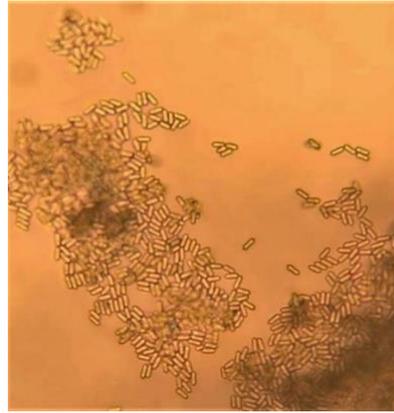
MTH-09

Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.



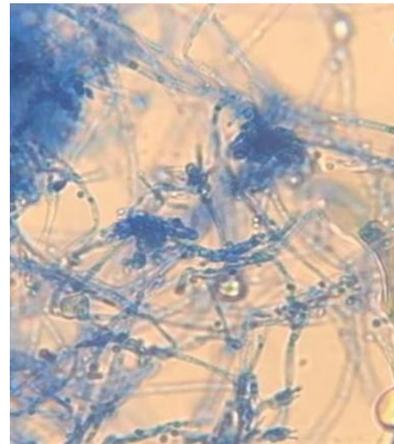
MTH-10

Conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente.



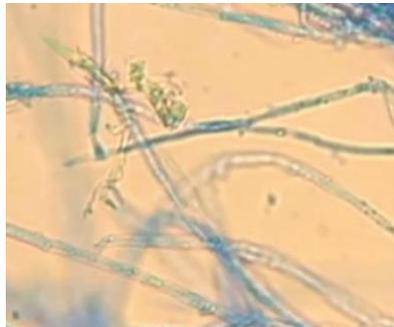
PCS-01

Conidióforos ramificados con hasta seis fiálides, conidio ovoide.



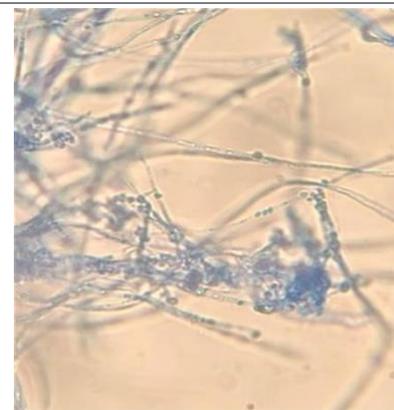
PCS-02

Conidióforos ramificados con hasta seis fiálides, conidio ovoide.



PCS-03

Conidióforos ramificados con hasta seis fiálides, conidio ovoide.



PCS-04

Conidióforos ramificados con hasta seis fiálides, conidio ovoide.



PCS-05

Conidióforos ramificados con hasta seis fiálides, conidio ovoide.



Las cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium* no presentan variaciones entre ellas, formando conidióforos ramificados en forma de candelabro con dos o tres ramas cada uno, conidios cilíndricos-ligeramente elipsoidales formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente. Esto coincide con lo expuesto por **Contreras & Bustillo (2019)**, en donde *M. anisopliae* presenta conidios cilíndricos-elipsoidales, conidióforo que se ramifica en forma de candelabro y células conidiógenas densas. **Toscano & Yucailla (2018)**, de igual forma caracterizó microscópicamente a *Metarhizium spp*, con conidios cilíndricos que forman cadenas de una coloración verdoza y largas. **García, Capello, Leshner, & Molina (2011)**, describió a *M. anisopliae* con conidios de coloración verde oliva, con extremos lisos, redondeados, formando cadenas largas.

Las cepas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces*, no tienen variaciones entre ellas, presentando todas las cepas conidióforos ramificados con hasta seis fialides y conidio ovoide. *Paecilomyces* tiene 2 subdivisiones las cuales son *Isarioidea* y *Paecilomyces*, siendo este último no entomopatógeno, mientras que *Isarioidea* si es entomopatógeno. Dentro de esta subdivisión se encuentran 5 especies, las cuales se caracterizan por controlar plagas. Estas son *P. javanicus*, *P. amoenoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, y *P.*

fumosoroseus. *P. fumosoroseus* tiene conidios de una coloración grisácea rosada, ovoides, hialinas, además de conidióforos en cadenas largas, fiálides cilíndricas, y ramificaciones verticiladas (Chan, 2009), lo cual coinciden con lo señalado en el presente estudio. De igual forma Rodríguez & Del Pozo (2003), describe a *Paecilomyces fumosoroseus* con conidios cilíndricos formando cadenas largas, conidióforos que forman racimos de 3 a 6 fiálides, hifas hialinas y lisas.

3.2. Verificación de la hipótesis

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa concluyendo que algunas especies aisladas de las muestras de suelo pertenecieron a hongos entomopatógenos.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

La cría de *G. mellonella* se dio colocando inicialmente 10 adultos macho – hembra por cada recipiente, siendo en total 5 recipientes. Se adicionó panal de abeja, agua y la dieta artificial a base de salvado de trigo, miel de abeja y glicerol. El proceso de cría se mantuvo por 3 generaciones, obteniendo 250 larvas en cada generación, de estas, 200 sirvieron para detectar y multiplicar *in vivo* los hongos entomopatógenos, mientras que los 50 restantes se utilizaron para continuar con el proceso de crianza de las próximas generaciones.

De las 23 muestras recolectadas de suelo, el 56.52% de éstas dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de hongos entomopatógenos, siendo el 45.45% perteneciente a *Metarhizium*, el 31.82% a *Beauveria*, y el 22.73% restante a *Paecilomyces*. Encontrándose 7 cepas de *Beauveria*: 4 en Pelileo, 2 en Santa Rosa y 1 en Quisapincha. 10 cepas de *Metarhizium*: 3 en Pelileo, 1 en Santa Rosa, 3 en Quisapincha y 3 en Unamuncho. Y 5 cepas de *Paecilomyces*: 3 en Pelileo, 1 en Quisapincha y 1 en Unamuncho.

En las características macroscópicas se determinó las cepas de *Beauveria sp.* debido a su textura algodonosa de color blanco, micelio irregular y una coloración amarilla al reverso. *Metarhizium sp.* presentó una textura algodonosa de color verde olivo en el centro, micelio irregular y una coloración amarillo verdoso al reverso. Finalmente, *Paecilomyces sp.* mostró una textura inicial algodonosa de color marrón grisáceo, micelio irregular y color crema al reverso.

En las características microscópicas se determinó las cepas de *Beauveria sp.* debido a sus células conidiogénicas típicas de la especie y conidios sub globosos-elipsoidales. *Metarhizium sp.* mostró conidióforos ramificados en forma de candelabro con dos o tres ramas cada uno, conidios cilíndricos ligeramente elipsoidales, formando cadenas largas, algunas adheridas lateralmente. Finalmente, *Paecilomyces sp.* presentó conidióforos ramificados con hasta seis fiálides y conidio ovoide.

4.2. Recomendaciones

Al momento de realizar la crianza de *Galleria mellonella* es recomendable no colocar agua en mucha cantidad ya que provoca la contaminación por bacterias lo cual disminuye la efectividad del proceso.

Se debe continuar con la investigación de la caracterización molecular de los hongos entomopatógenos que fueron aislados: *Beuveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, con la finalidad de subdividirlos adecuadamente según la especie a la cual pertenecen.

Se debe realizar ensayos en invernaderos utilizando los hongos entomopatógenos aislados colocándolos en plantas que sean de interés en la agricultura, con la finalidad de comprobar la efectividad en el control de plagas que presenten dichos hongos.

Debido a la posible existencia de alta concentración de hongos entomopatógenos en los sitios de muestreo realizados, se debe continuar con su aislamiento y caracterización, lo cual serviría para obtener cepas a nivel comercial con la finalidad de controlar biológicamente las plagas.

BIBLIOGRAFÍA

- Archuleta, A., García, C., & Gaxiola, L. (2009). Uso de *Galleria mellonella* L. para el aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas en Sinaloa. *CIIDIR COFAA*, 394-396. Obtenido de <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2009/CB/394-396.pdf>
- Bazán, R., & Wilson, A. (2017). Efecto de la temperatura en el ciclo de desarrollo de *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae). *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo*, 63-69. Obtenido de [https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/2133#:~:text=Los%20resultados%20mostraron%20que%20la,fue%20menor%20\(45.85%20días\)](https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/2133#:~:text=Los%20resultados%20mostraron%20que%20la,fue%20menor%20(45.85%20días)).
- Berumen, D. (2017). *Caracterización de aislados del hongo Metarhizium provenientes del sur del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal*. Obtenido de <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/377>
- Cañedo, V. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos*. Obtenido de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. 62. Lima, Perú. Obtenido de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Carbonero, C., & Córdova, M. (2014). Aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas de ICA y su efectividad in vitro en el control de Spodoptera frugiperda (Smith), Enero - Marzo 2013. ICA, Perú. Obtenido de <https://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/UNICA/2200/500.040.0000007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carr, A., Elósegui, O., & Bel, N. (2003). Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broum & Smith. *Fitosanidad*, 7(3), 27-32. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209118166006.pdf>
- Castillo. (Diciembre de 2002). *DESTINO DEL HONGO ENTOMOPATOGENO Paecilomyces fumosoroseus (Wize & Brown) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) EN SUELOS AGRÍCOLAS*. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/6768/1/1080124409.PDF>
- Castillo, C., Cañizalez, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana* aislada de diferentes insectos en Trujillo-Venezuela. *ACADEMIA*, XI(23), 275-281. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/271825762_CHARACTERIZACION_MORFOLOGICA_DE_BEAUVERIA_BASSIANA_AISLADA_DE_DIFERENTES_INSECTOS_EN_TRUJILLO-_VENEZUELA
- Castillo, C., Cañizalez, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. (17 de Febrero de 2012). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE

BEAUVERIA BASSIANA, AISLADA DE DIFERENTES INSECTOS EN TRUJILLO - VENEZUELA. *Revista ACADEMIA*, 275-281. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/271825762_CHARACTERIZACION_MORFOLOGICA_DE_BEAUVERIA_BASSIANA_AISLADA_DE_DIFERENTES_INSECTOS_EN_TRUJILLO-_VENEZUELA

- Castro, J. (24 de Junio de 2010). *EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO QUE EJERCE LA SIMBIOSIS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO (Paecilomyces fumosoroseus) JUNTO CON EL ORGANISMO QUITINOLÍTICO AISLADO A PARTIR DE CASCARILLA DE CAMARÓN SOBRE EL ÁCARO (Tetranychus urticae) FITOPATÓGENO DE ROSAS*. Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/758/1/T-ESPE-029609.pdf>
- Chan, W. (Agosto de 2009). *Caracterización fisiológica y molecular de Paecilomyces fumosoroseus (Wixe) Brown & Smith y su patogenicidad en estadios inmaduros de Bemisia tabaci (Gennadius)*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Wilberth-Chan-Cupul/publication/328615790_CHARACTERIZACION_FISIOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_Paecilomyces_fumosoroseus_WIZE_BROWN_SMITH_Y_SU_PATOGENICIDAD_EN_ESTADIOS_INMADUROS_DE_Bemisia_tabaci_GENNADIUS/links/5bd8e1f04585150
- Chan, W. (Agosto de 2009). *CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE Paecilomyces fumosoroseus (WIZE) BROWN & SMITH Y SU PATOGENICIDAD EN ESTADIOS INMADUROS DE Bemisia tabaci (GENNADIUS)*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/328615790_CHARACTERIZACION_FISIOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_Paecilomyces_fumosoroseus_WIZE_BROWN_SMITH_Y_SU_PATOGENICIDAD_EN_ESTADIOS_INMADUROS_DE_Bemisia_tabaci_GENNADIUS
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Beauveria Basianna, Hongo entomopatígeno para el control biológico de hormigas cortadoras*. Obtenido de <http://repositorio.ica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=D6BC6B010331436136C036D72FC40E8C?sequence=1>
- Contreras, L., & Bustillo, A. (27 de Septiembre de 2019). *Caracterización morfológica de cepas de hongos entomopatógenos de Beauveria bassiana, Cordyceps spp., Metarhizium spp. y Purpureocillium lilacinum*. Obtenido de https://www.cenipalma.org/wp-content/uploads/2019/10/1.-Caracterización-morfológica-de-cepas-de-hongos-entomopatógenos-de-Beauveria-bassiana_compressed.pdf
- De la Cruz, M., Cortez, H., Ortiz, C., Cappello, S., & Pérez, M. (2014). *Cepas monospóricas de Metarhizium anisopliae y su patogenicidad sobre Galleria mellonella en Tabasco, México*. *Revista Mexicana Ciencia*, V(2), 171-180. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v5n2/v5n2a4.pdf>
- Devine, G., Eza, D., Ogusuki, E., & Furong, M. (2008). *Uso de insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas*. *Revista peruana de medicina experimental y salud*

- pública*, 25(1), 74-100. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/363/36311619011.pdf>
- Egas, C., & Tinajero, M. (Marzo de 2016). Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12142/1/UPS-QT09705.pdf>
- Elósegui, O., Jiménez, J., & Carr, A. (2006). Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. *Revista Fitosanidad*, 10(4), 265-272. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116183003.pdf>
- FAO. (Mayo de 2002). *Manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hidropónicos en invernadero*. Obtenido de http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/aup/pdf/mip.pdf
- Frye, O. (2012). *EVALUACIÓN Y USO DE POTENZIA® (Paecilomyces fumosoroseus) EN EL MANEJO INTEGRADO DEL ACARO BLANCO CAUSANTE DEL VANEAMIENTO DEL ARROZ Steneotarsonemus spinki Smiley, 1967*. Obtenido de <http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/1096/1/RIUT-FAA-spa-2014-Evaluación%20y%20uso%20de%20Potenzia®%20%28paecilomyces%20fumosoroseus%29%20en%20el%20manejo%20integrado%20del%20acar%20blanco%20causante%20del%20vaneamiento%20del%20arroz%20steneotarsone>
- Galán, L. (Julio de 2012). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLAS DE MÉXICO*. Obtenido de <https://cd.dgb.uanl.mx/bitstream/handle/201504211/16318/20093.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gandarilla, F. (Noviembre de 2012). *EVALUACIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE ZONAS CITRÍCOLAS SOBRE Diaphoria citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)*. Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/2802/1/1080237547.pdf>
- García, M., Capello, S., Leshner, J., & Molina, R. (14 de Julio de 2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *mearhizium anisopliar*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4578/457845138002.pdf>
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
- González, M., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2012). Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, VIII(8), 42-55.

- González, M., Rodríguez, R., & Rivera, I. (2016). *Aislamiento, cultivo e identificación morfológica y molecular de hongos entomopatógenos*. Obtenido de <https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/II/carteles/CII-41.pdf>
- Google-Earth. (2021). *Google Earth*. Obtenido de https://earth.google.com/web/search/bioseb+organics/@-1.20797028,-78.58612589,2625.32992675a,4473.01782901d,35y,36.21426657h,45.02171606t,0r/data=CnoaUBJKCiUweDkxZDM4MTBjYjY3ZTFkOGI6MHg4OGJkMTJjNTM3YmE5ZGIyGRe30QDeQvO_IWjyg6kcplPAKg9iaW9zZWlgb3JnYW5pY3MYA
- Hernández, M., Espíndola, Z., Villalobos, F., García, L., & Peña, G. (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27(3), 591-599. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v27n3/v27n3a7.pdf>
- Hernández, V., & Berlanga, A. (1999). *Uso de Beauveria bassiana como insecticida microbial*. Bogotá: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.
- Jiménez, M., Gutiérrez, C., Rosas, N., López, M., & Saínz, J. (2015). FORMULACIÓN DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN CON POLÍMEROS BIODEGRADABLES Y SU VIRULENCIA CONTRA *Heliothis virescens* (FABRICIUS). *SCIELO*, III(31), 219-226. Obtenido de </v31n3a1www.scielo.org.mx/pdf/rca/v31n3.pdf>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*(63), 95-103. Obtenido de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>
- Noboa, G., & Quelal, A. (Mayo de 2015). *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productores de café orgánico de la asociación "Río INTAG", cantón Cotacachi*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, XXXI(12), 856-860. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>
- Realpe, F., Bustillo, A., & López, J. (2007). Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2), 142-157. Obtenido de <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058%2802%29142-157.pdf>
- Restrepo, A., Arias, P., & Soto, A. (2019). Efecto de diferentes fuentes de miel en la cría de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) para la multiplicación de nematodos entomopatógenos. *bio.cient. mus. hist. nar.*, XXIII(1), 73-81. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v23n1/0123-3068-bccm-23-01-00073.pdf>

- Rodríguez. (2015). *CICLO BIOLÓGICO DE Galleria mellonella Linnaeus (LEPIDOPTERA PYRALIDAE)*. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2107/H10-R67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez. (2015). *CICLO BIOLÓGICO DE Galleria mellonella Linnaeus (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)*. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2107/H10-R67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, L. (2015). *Ciclo biológico de Galleria mellonella Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae)*. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2107/H10-R67-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, S., & Del Pozo, E. (2003). Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, VII(2), 71-78. Obtenido de <http://fagro2.fagro.edu.uy/agrociencia/index.php/directorio/article/view/374/293>
- Romero, F. (2004). Manejo Integrado de Plagas. Las bases, los conceptos y su mercantilización. Obtenido de <http://agro.unc.edu.ar/~biblio/Manejo%20de%20Plagas.pdf>
- Rubio, V., & Fereres, A. (2017). *Control Biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/36025273.pdf>
- Samaniego, J. (8 de Diciembre de 2015). Efectos de la concentración de carbono y la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de conidias de *Paecilomyces lilacinus*. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5593/1/122678.pdf>
- Sánchez, L. (Diciembre de 2013). *Manejo y producción del hongo Paecilomyces fumosoroseus en el Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya*. Obtenido de http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/agro/agro-2013-1.pdf
- Santos, M., Contreras, M., Blanco, M., Castro, M., Meza, J., & García, M. (2016). *Introducción a la cría masiva de Galleria mellonella para el aislamiento de hongos entomopatógenos y reproducción de nemátodos en la ciudad de Monterrey Nuevo León*. Obtenido de <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2008/CB/479-482.pdf>
- Téllez, A., Cruz, M., Mercado, Y., Asaff, A., & Arana, A. (9 de Octubre de 2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 73-80. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a7.pdf>

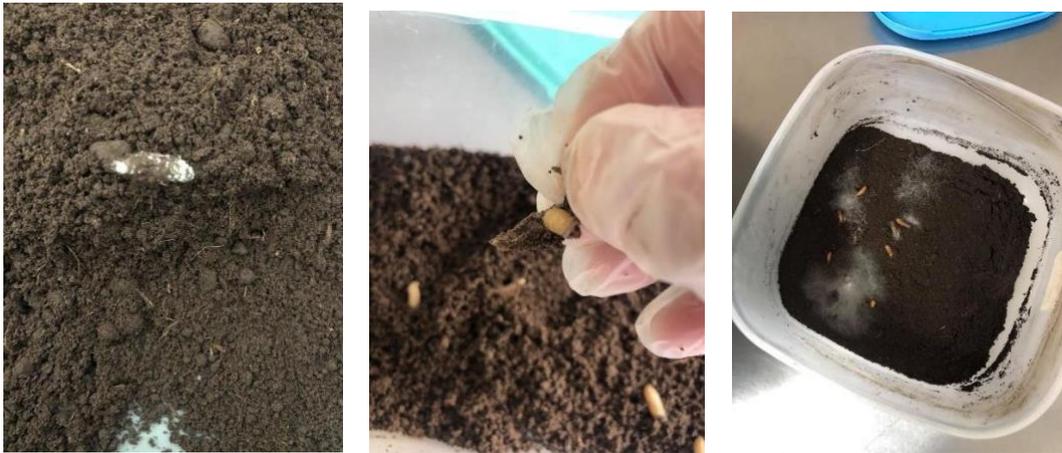
- Téllez, J., Cruz, R., Mercado, F., Asaff, T., & Arana, C. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*. Obtenido de https://www.intagri.com/public_files/Beauveria.pdf
- Toscano, F., & Yucailla, D. (2018). *Caracterización de aislamientos nativos de Metarhizium spp. en suelos de cultivos de caña de azúcar de la Parroquia Tarqui*. Obtenido de <https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/476/1/T.AMB.B.UEA.3161.pdf>
- Ulloa, J., Mondragón, P., Rodríguez, R., Reséndiz, J., & Ulloa, P. (2010). La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente*, 2(4). Obtenido de <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/437/1/La%20miel%20de%20abeja%20y%20su%20importancia.pdf>
- Unsal, S., Ozparlak, H., & Aktumsek, A. (2004). Effects of diflubenzuron on the integument of fifth instar *Galleria mellonella* larvae. *Phytoparasitica*, 32(1), 43-51. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/BF02980858>
- Zapata, N., Ceballos, R., Céspedes, C., Alarcon, J., & Leyton, A. (2015). Actividad insecticida y reguladora del crecimiento de extractos de *Blechnum chilense* (Blechnaceae) y *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae), sobre larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 15(2), 77-87. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/856/85645596001.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestras de suelo.



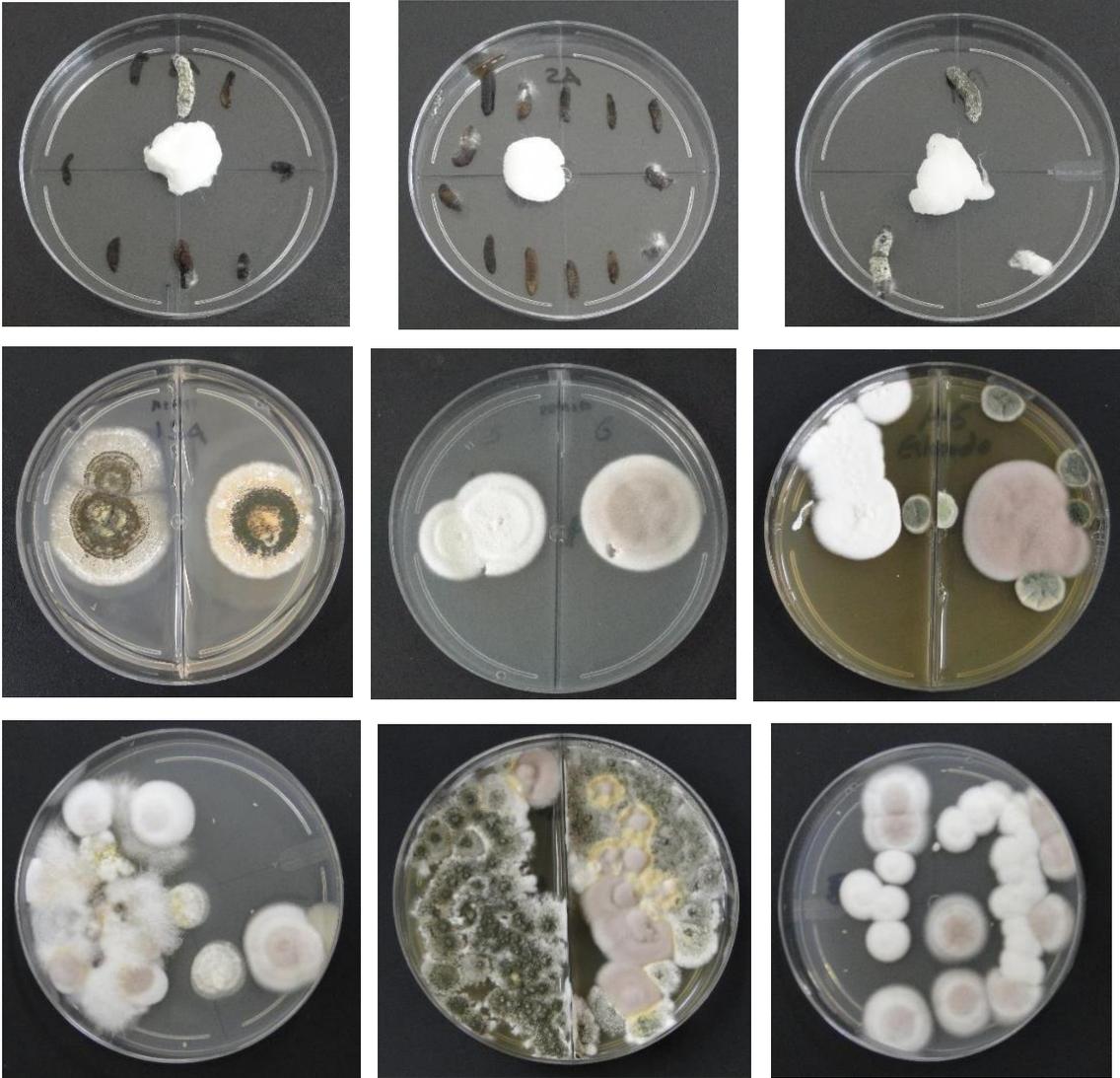
Anexo 2. Monitoreo diario de *G. mellonella* en muestra de suelo.



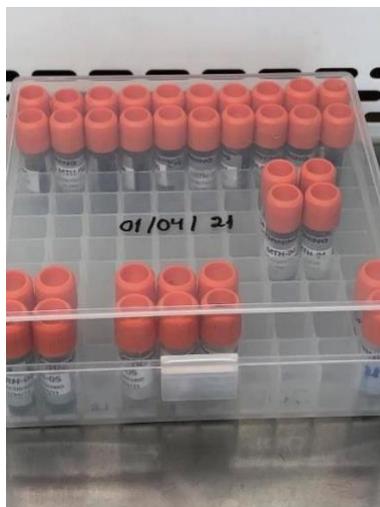
Anexo 3. Medios PDA



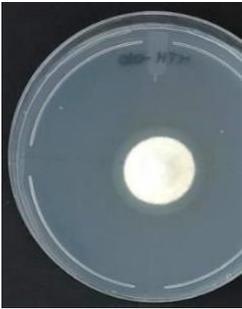
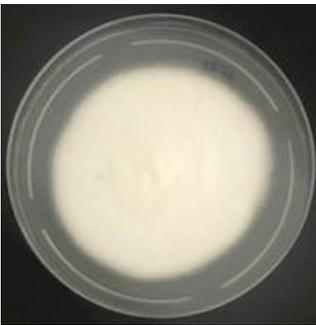
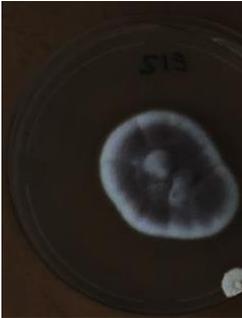
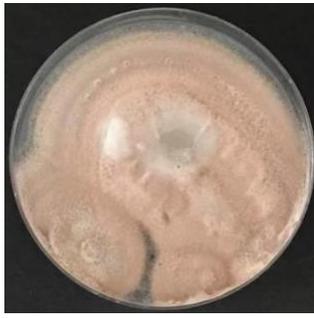
Anexo 4. Aislamientos y purificaciones de hongos entomopatógenos



Anexo 5. Almacenamiento y conservación de cepas puras en Glicerol al 20%.



Anexo 6. Crecimiento de los hongos entomopatógenos identificados, a lo largo de 1, 2 y 3 semanas

Hongo	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>Metarhizium sp.</i> (MTH - 010)			
<i>Beauveria sp.</i> (BBA-04)			
<i>Paecilomyces sp.</i> (PCS-05)			

Anexo 7. *Beauveria spp.* de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua

Sector	Procedencia de suelo	Clave de Aislamiento
Pelileo	TOA	BBA-01
	Hodon	BBA-02
	Loka	BBA-03
	P.N.T	BBA-04
Santa Rosa	Misquilli - H	BBA-05
	Bellavista	BBA-06
Quisapincha	Putugleo - C	BBA-07

Anexo 8. Resumen de aislamientos de *Metarhizium spp.* de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua

Sector	Procedencia de suelo	Clave de Aislamiento
Pelileo	Toa	MTH-01
	Hondon	MTH-02
	P.N.T	MTH-03
Santa Rosa	Bellavista	MTH-04
Quisapincha	Putugleo - C	MTH-05
	Putugleo - H	MTH-06
	Ambatillo	MTH-07
Unamuncho	San Jorge	MTH-08
	San Pablo – Invernadero 3	MTH-09
	San José	MTH-10

Anexo 9. Resumen de aislamientos de *Paecilomyces spp.* de las diferentes zonas agrícolas de Tungurahua

Sector	Procedencia de suelo	Clave de Aislamiento
Pelileo	Toa	PCS-01
	Hodon	PCS-02
	P.N.T	PCS-03
Quisapincha	Putugleo - C	PCS-04
Unamuncho	San Jorge	PCS-05