



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la capacidad antagónica de *Metarhizium anisopliae*
microencapsulada frente a *Phyllophaga spp.*

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción: Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Wendy Tatiana Carrera Núñez

Tutora: Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas.

Ambato- Ecuador

Febrero -2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

CERTIFICA

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecido en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de enero 2024.

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

180272662-8

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Wendy Tatiana Carrera Núñez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Wendy Tatiana Carrera Núñez

1850019033

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del 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.



Wendy Tatiana Carrera Núñez

1850019033

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Ing. López Hernández Orestes Darío, PhD

1754784864

Mg. Juan de Dios Espinoza Moya

1803201431

Ambato 06 de febrero del 2024

DEDICATORIA

A Dios y a la vida por permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres Adán y Carmen por su apoyo y amor incondicional, por no dejar de creer en mí y ser parte de cada proceso y cada meta que he ido alcanzando, el conocimiento es mío, pero el título es de ustedes.

A mis hermanos Amalia, Guadalupe y Ronald, a mis cuñados Ricardo, Alberto y Lorena, a mis queridos sobrinos; Leandro, Ariel, Josué, Mati, Maritza y los clones Dylan y William por toda su apoyo incondicional y desinteresado durante todo este proceso, por siempre tenderme una mano cuando lo he necesitado consejos y palabras que de una u otra forma han permitido que hoy llegue hasta aquí.

A mi compañero de vida Martín Sánchez, gracias por su amor, paciencia y apoyo durante toda mi etapa universitaria, por haber sido ese pilar en donde sostenerme y estar en todas aquellas ocasiones donde el estrés, miedo y angustia se apoderaban de mí, dándome palabras de aliento y un abrazo cuando más lo he necesitado.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, así como a docentes y personal administrativo que fueron parte de este proceso de formación.

De manera especial a mi tutora Mg. Ruth Pérez por su paciencia, enseñanzas y apoyo durante la realización de este proyecto de investigación, gracias por no dejar de creer en mí y por no dejar que me rindiera.

De la misma manera, un agradecimiento al PhD. Michel Leiva y a la MVZ. Viviana Rodríguez por su ayuda desinteresada durante la realización de esta investigación.

A la familia que la universidad me regalo Ketsi, Joshua, Gonza, Cayo, Lichita, Carito, Estefy S y Kevin L, gracias por los momentos compartidos, las anécdotas voy a extrañar los almuerzos donde se podía reír y olvidar el estrés de las clases o simplemente compartir un buen momento entre amigos.

A todos quienes fueron parte de este bonito proceso y pusieron su granito de arena, quedo eternamente agradecida y que la vida les multiplique todo lo bueno que han hecho por mí.

-Dios les pague-

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| APROBACIÓN DEL TUTOR..... | ii |
| AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN..... | iii |
| DERECHOS DE AUTOR..... | iv |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO | v |
| DEDICATORIA..... | vi |
| AGRADECIMIENTO..... | vii |
| ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xii |
| RESUMEN EJECUTIVO | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1. Justificación..... | 1 |
| 1.1.1. Generalidades del cultivo de mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth)..... | 2 |
| 1.1.1.2. Importancia económica y comercial de la mora de Castilla | 2 |
| 1.1.1.3. Plagas asociadas al cultivo de mora de Castilla | 3 |
| 1.1.2. Generalidades del insecto patógeno <i>Phyllophaga spp</i> | 4 |
| 1.1.2.2. Daños que produce el insecto <i>Phyllophaga spp</i> en la mora de Castilla | 5 |
| 1.1.2.3. Síntomas de los daños provocados por <i>Phyllophaga spp</i> | 6 |
| 1.1.3. Métodos para el manejo de plagas | 6 |
| 1.1.3.1. Método de control cultural | 7 |
| 1.1.3.2. Método control físico | 7 |
| 1.1.3.3. Método control químico | 7 |
| 1.1.3.4. Métodos de control biológico..... | 7 |
| 1.1.4. Uso de hongos entomopatógenos para control de plagas..... | 8 |
| 1.1.4.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> | 8 |
| 1.1.4.3. Modo de acción de <i>M. anisopliae</i> | 9 |
| 1.1.4.5. Fijación | 10 |
| 1.1.4.6. Penetración | 10 |
| 1.1.4.7. Colonización..... | 10 |
| 1.1.4.8. Esporulación | 11 |

| | |
|--|----|
| 1.1.4.5. <i>M. anisopliae</i> como alternativa de biocontrolador..... | 11 |
| 1.1.5 Técnicas de microencapsulación de hongos entomopatógenos | 11 |
| 1.1.5.1 Secado por aspersión | 12 |
| 1.1.5.2 Gelificación iónica | 12 |
| 1.2. Objetivos | 13 |
| 1.2.1. Objetivo General | 13 |
| 1.2.2. Objetivos Especificos | 13 |
| 1.3. Hipótesis..... | 13 |
| 1.3.1. Hipótesis Nula | 13 |
| 1.3.2. Hipótesis Alternativa..... | 13 |
| CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA..... | 14 |
| 2.1 Materiales | 14 |
| 2.2. Métodos..... | 14 |
| 2.2.1. Captura de <i>Phyllophaga spp</i> a partir de mora | 14 |
| 2.2.1.1. Muestreo de <i>Phyllophaga spp</i> | 15 |
| 2.2.1.2. Trampeo y recolección de la muestra..... | 15 |
| 2.2.2. Microencapsulación de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 15 |
| 2.2.2.1. Obtención de la materia prima | 15 |
| 2.2.2.2. Multiplicación de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 16 |
| 2.2.2.3. Recolección de conidios..... | 16 |
| 2.2.2.4. Microencapsulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> mediante secado por aspersión. | 16 |
| 2.2.2.5. Microencapsulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> mediante gelificación iónica. | 17 |
| 2.2.2.6. Evaluación de la viabilidad de los microencapsulados. | 17 |
| 2.2.3. Demostración de la capacidad antagónica de las microcápsulas de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> frente a <i>Phyllophaga spp</i> | 17 |
| 2.2.3.1 Pruebas <i>in vitro</i> entre <i>M. anisopliae</i> y <i>Phyllophaga spp</i> | 17 |
| 2.2.3.2. Cálculo del porcentaje de efectividad biológica. | 19 |
| 2.2.3.3. Estimación de tiempo de muerte larvaria | 20 |
| 2.2.3.4. Análisis Estadístico | 20 |
| CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 21 |
| 3.1. Análisis y discusión de los resultados..... | 21 |
| 3.1.1. Muestreo y captura de <i>Phyllophaga spp</i> en estado larvario a partir de mora de Castilla..... | 21 |
| 3.1.1.1. Identificación de las larvas de <i>Phyllophaga spp</i> | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2. Producción y microencapsulación de conidios de <i>M. anisopliae</i> mediante secado por aspersión y gelificación iónica. | 25 |
| 3.1.2.1 Producción de conidios de <i>M. anisopliae</i> | 25 |
| 3.1.2.2 Encapsulación..... | 27 |
| 3.1.3. Evaluación de las pruebas <i>in vitro</i> de las microcápsulas de <i>M. anisopliae</i> frente a <i>Phyllophaga spp.</i> | 29 |
| 3.1.4. Análisis estadístico..... | 34 |
| 3.2. Verificación de hipótesis..... | 35 |
| CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 36 |
| 4.1. Conclusiones | 36 |
| 4.2. Recomendaciones..... | 37 |
| MATERIALES DE REFERENCIA..... | 38 |
| Referencias Bibliográficas | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la mora de Castilla | 2 |
| Tabla 2. Tipos de plagas que afectan a la producción de mora de Castilla..... | 3 |
| Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Phyllophaga spp.</i> | 5 |
| Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>M. anisopliae</i> | 9 |
| Tabla 5. Materiales de laboratorio usados..... | 14 |
| Tabla 6. Escala de severidad de la infección ocasionada por <i>M. anisopliae</i> en larvas de segundo estadio de <i>Phyllophaga spp.</i> | 18 |
| Tabla 7. Identificación morfológica de larvas de <i>Phyllophaga spp.</i> | 23 |
| Tabla 8. Componentes de microencapsulación de conidios para el secado por aspersión..... | 27 |
| Tabla 9. Componentes para la encapsulación de conidios en alginato de sodio y cloruro de calcio..... | 27 |
| Tabla 10. Rendimiento de los procesos de encapsulación..... | 28 |
| Tabla 11. Porcentaje de viabilidad de conidios después del secado por aspersión... .. | 28 |
| Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de conidios después de la gelificación iónica... .. | 28 |
| Tabla 13. Factores en estudio..... | 29 |
| Tabla 14. Codificación de los tratamientos..... | 29 |
| Tabla 15. Información para el análisis estadístico..... | 30 |
| Tabla 16. Tabla de efectividad biológica de los tratamientos en relación con el control | 33 |
| Tabla 17. ANOVA de días a la infección y porcentaje de severidad..... | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Etapas biológicas de <i>Phyllophaga spp.</i> | 5 |
| Figura 2. Estadios larvarios de <i>Phyllophaga spp.</i> | 6 |
| Figura 3. Características morfológicas de <i>M. anisopliae</i> | 8 |
| Figura 4. Ciclo de infección del hongo <i>M. anisopliae</i> | 9 |
| Figura 5. Muestreo de plantas de mora con sintomatología de <i>Phyllophaga spp.</i> ... | 21 |
| Figura 6. Siembra en cajas de Petri de <i>M. anisopliae</i> | 26 |
| Figura 7. Promedio de las medias de acuerdo con los días de infección. | 30 |
| Figura 8. Promedio de las medias de acuerdo con el porcentaje de severidad. | 32 |

RESUMEN EJECUTIVO

La mora de Castilla es una fruta con elevado valor nutricional y comercial en el Ecuador, pero es afectada por plagas de insectos como *Phyllophaga spp*, se alimenta de raíces y permite el ingreso a microorganismos patógenos como *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* generando pudrición en las raíces y muerte de las plantas. Se ha demostrado el control de esta plaga con el uso de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, sin embargo, su eficacia en campo se ve afectada por factores abióticos, encontrado en la microencapsulación una técnica que permite proteger y potenciar a este hongo.

La investigación permitió el crecimiento y esporulación de conidios de *M. anisopliae* *in vitro* en cajas de Petri, la microencapsulación fue mediante secado por aspersion con maltodextrina y goma arábica y la gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio. Se aplicaron 9 tratamientos con los encapsulados, las larvas fueron ubicadas en cámara humedad e infectadas con 1 miligramo por larva para ser evaluados en un periodo de 7 días.

Se encontró 270 larvas del género *Phyllophaga spp*, para su control el mejor tratamiento fue la gelificación iónica con una concentración de 1 por diez a la 9, con el mayor número de larvas infectadas al cuarto día y una severidad de 52,38 por ciento y el tratamiento menos efectivo correspondió a al secado por aspersion con una concentración de 1 por diez a la 5 al cuarto día y presento una severidad de infección de 34, 28 por ciento.

Palabras clave: Biotecnología agrícola, control biológico, microencapsulación, *Metarhizium anisopliae*, *Phyllophaga spp*, mora de Castilla

ABSTRACT

The Castilla blackberry is a fruit with high nutritional and commercial value in Ecuador, but it is affected by insect pests such as *Phyllophaga spp*, it feeds on roots and allows the entry of pathogenic microorganisms such as *Fusarium*, *Phytophthora* and *Rhizoctonia*, generating rot in the roots. and plant death. The control of this pest has been demonstrated with the use of entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae*, however, its effectiveness in the field is affected by abiotic factors, found in microencapsulation a technique that allows this fungus to be protected and enhanced.

The research allowed the growth and sporulation of conidia of *M. anisopliae in vitro* in Petri dishes, microencapsulation was by spray drying with maltodextrin and gum arabic and ionic gelation with sodium alginate and calcium chloride. 9 treatments were applied with the encapsulates, the larvae were placed in a humidity chamber and infected with 1 milligram per larva to be evaluated over a period of 7 days.

270 larvae of the genus *Phyllophaga spp* were found, for its control the best treatment was ionic gelation with a concentration of 1 by ten to 9, with the highest number of infected larvae on the fourth day and a severity of 52.38 percent and the least effective treatment corresponded to spray drying with a concentration of 1 to 10 to 5 on the fourth day and presented an infection severity of 34.28 percent.

Keywords: Agricultural biotechnology, biological control, microencapsulation, *Metarhizium anisopliae*, *Phyllophaga spp*, blackberry

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Justificación

La mora contiene un elevado valor nutricional y su comercialización representa importantes ingresos económicos para los fruticultores de la sierra Interandina del Ecuador (**Viera et al., 2019**). Su distribución geográfica está en las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Azuay, Imbabura, Carchi y Tungurahua (**Mosquera et al., 2016**).

El cultivo es afectado por diferentes tipos de plagas del suelo, principalmente coleópteros como *Phyllophaga spp* conocida también como gallina ciega (**Oliveira & Frizzas, 2021**). Su ciclo biológico es de dos años, donde los huevecillos eclosionan, generando larvas que se alimentan de las raíces, provocando heridas que permiten el ingreso de microorganismos patógenos, ocasionando amarillamiento, marchitez y muerte a las plantas (**Glare et al., 2017**). Comúnmente se utiliza insecticidas químicos con el fin de combatir estas plagas, pero su uso genera problemas ambientales y complicaciones en la salud de los agricultores y de quienes consumen la fruta (**Valle et al., 2021**).

Para reducir la utilización de estos productos se buscan alternativas al manejo de plagas donde se considere la seguridad alimentaria y ambiental, el control biológico con hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* representa una opción viable para este tipo de problemas (**Chirinos et al., 2020**), debido a que inhibe el crecimiento del insecto patógeno, penetrando en el interior de su cuerpo y produciendo toxinas que causan su muerte (**Pacheco et al., 2019**).

La eficacia del hongo se ve afectada por factores ambientales, por lo que una formulación encapsulada permite proteger y aumentar el tiempo de vida útil del hongo, otorgándole estabilidad frente a la radiación ultravioleta, presión osmótica, humedad y temperatura (**Rodríguez et al. 2020**). Es por esto, que la presente investigación tiene

como objetivo evaluar la capacidad antagónica de *M. anisopliae* microencapsulada frente a *Phyllophaga spp* como referente en el diseño de bioproductos para la industria en el campo de la biotecnología agrícola.

1.1.1. Generalidades del cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una planta nativa de los Andes, crece durante todo el año en climas fríos y templados (Horvitz et al., 2017), con tallos semierguidos, espinosos, hojas trifoliadas, verdes por el haz y vellosos por el envés, sus flores son blancas con numerosos estambres que se autofecundan y frutos de 4 cm de longitud de color que va de rojo a púrpura (Villalba et al., 2009).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la mora de Castilla

| | Taxonomía |
|-----------------|---------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Rosidae |
| Orden | Rosales |
| Familia | Rosaceae |
| Género | <i>Rubus</i> L. |
| Especie | <i>Rubus glaucus</i> Beth |

Fuente: (Franco et al., 2020).

1.1.1.2. Importancia económica y comercial de la mora de Castilla

Según el boletín situacional del 2022 publicado por el **Ministerio de Agricultura y ganadería (2023)** la mora en la provincia de Tungurahua tiene una superficie de cultivo de 775 ha con una producción de 7.666 t obteniendo así un rendimiento de 9.89 t/ha posicionándola como la tercera provincia con más rendimiento nacional.

Actualmente, existe un incremento nacional del 19 % del cultivo, por su uso agroindustrial, los frutos se consumen frescos o procesados en pulpas, jugos, mermeladas o postres, además son muy apreciados por su color, sabor, atributos nutricionales como vitaminas, minerales y alto contenidos en polifenoles (**Junqueira et al., 2016**). Pero este incremento se ha visto gravemente afectado por diversos problemas fitosanitarios originados por plagas que disminuyen la calidad y cantidad de la cosecha (**Díaz et al., 2011**).

1.1.1.3. Plagas asociadas al cultivo de mora de Castilla

Las plagas funcionan como vectores en la propagación de enfermedades y su alimentación crea heridas en las plantas, produciendo entrada a microorganismos patógenos (**Lewis et al., 2019**), entre las plagas de mayor importancia en el cultivo de mora se encuentra los pulgones, gallina ciega, ácaros (**Cevallos, 2020**).

Tabla 2. Tipos de plagas que afectan a la producción de mora de Castilla

| Tipo de plaga | Nombre científico | Afectación en las plantas de mora de Castilla |
|------------------------------|-------------------------------|---|
| Pulgones | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | Son insectos chupadores con un largo pico articulado utilizado para succionar la savia de los brotes, hojas y flores e inyectar toxinas que afectan la capacidad fotosintética, debilitando a las plantas y deformando los frutos, además producen un encrespamiento de las hojas y caída de los botones florales (Villares et al., 2016). |
| Cutzo o Gallina ciega | <i>Phyllophaga spp.</i> | Este insecto daña a la planta tanto en estado larval, trozando las raíces y produciendo el secamiento total de la planta, como en estado adulto masticando el follaje (Villares et al., 2016). Se desarrolla en el envés de las hojas de abajo hacia arriba de la planta, donde succionan el contenido de |

Ácaros *Acarí*

células epidérmicas y parenquimáticas, causando un colapso y muerte de las células, esto origina manchas cloróticas en el haz de las hojas en forma de puntitos amarillos, lo que disminuye la tasa de transpiración y la actividad fotosintética (**Villares et al., 2016**).

1.1.2. Generalidades del insecto patógeno *Phyllophaga spp*

Phyllophaga spp es un insecto de metamorfosis completa, teniendo un desarrollo comprendido en 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto (**Acuña et al., 2020**).

Huevo: normalmente tienen entre 1,5 y 3 mm de diámetro y se encuentran agregados en el suelo, el huevo es opaco, pequeño, esférico y de color blanco nacarado y suele oscurecerse justo antes de eclosionar (**Sapkota, 2006**).

Larva: las larvas jóvenes del escarabajo tienen un color gris oscuro y miden aproximadamente 5-8 mm de largo, mientras que las larvas completamente desarrolladas miden entre 20 a 45 mm de largo dependiendo de la especie, tiene forma de C, con un cuerpo brillante y liso, una cabeza de color marrón y seis patas delanteras distintas (**Sapkota, 2006**).

Pupa: tienen aproximadamente el mismo tamaño que el adulto, pueden tener un color blanco cremoso, amarillo pálido o marrón oscuro y su longitud varía de 20 a 24 mm de largo (**Sapkota, 2006**).

Adulto: los escarabajos miden entre 12 y 25 mm de largo, suelen ser de color amarillo o marrón rojizo a negro, robustos, oblongos y brillantes (**Sapkota, 2006**).

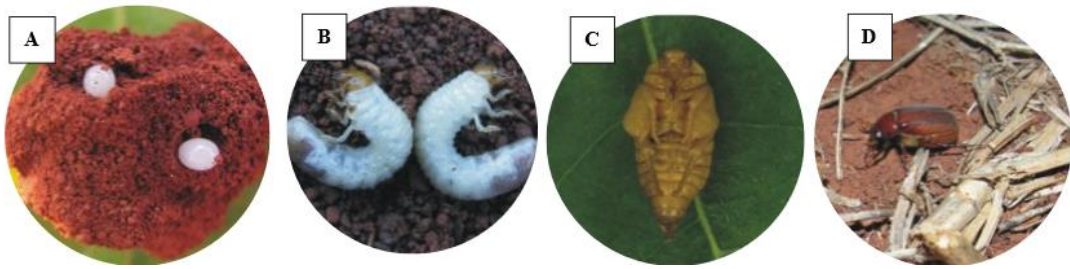


Figura 1. *Etapas biológicas de Phyllophaga spp.*

(A) huevos; (B) larvas; (C) pupa; (D) adulto. Adaptado de *How climate influences the biology and behaviour of Phyllophaga (Coleoptera: Melolonthidae) in the Brazilian Cerrado*. 58(2), 336–345, por Oliveira, C., & Frizzas, M. 2019. *Austral Entomology*.

Tabla 3. *Clasificación taxonómica de Phyllophaga spp.*

| Taxonomía | |
|------------------|-------------------------|
| Phylum | Arthropoda |
| Clase | Insecta |
| Orden | Coleóptera |
| Familia | Scarabaeidae |
| Género | <i>Phyllophaga</i> |
| Especie | <i>Phyllophaga spp.</i> |

Fuente: (Katovich, 2012)

1.1.2.2. Daños que produce el insecto *Phyllophaga spp* en la mora de Castilla

Las larvas de *Phyllophaga spp* son consideradas una plaga de importancia mundial, en el Ecuador el ataque de gallinas ciegas ha ido en crecimiento, esto debido a su gran adaptabilidad, encontrándose distribuidas en varias regiones del país y en distintos cultivos, provocando serias pérdidas económicas (Morocho et al., 2020).

El daño ocasionado por este insecto en el cultivo de mora de Castilla es en estado adulto y larvario, los adultos se alimentan del follaje, flores o haciendo masticaduras en los frutos. Mientras que el ciclo larvario se encuentra en el suelo a una profundidad de 15 a 25 cm hasta por dos años, este ciclo consta de 3 estadíos, siendo el segundo y

tercer estadio el que más daño causa debido a los hábitos rizófagos, destruyendo el sistema radicular de la planta (Acuña et al., 2020).

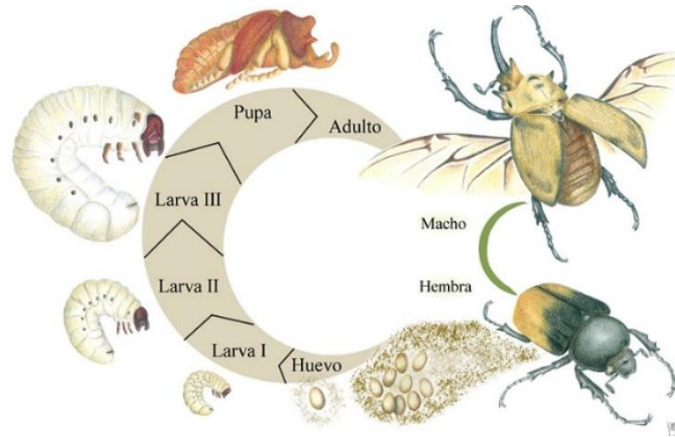


Figura 2. Estadios larvarios de *Phyllophaga* spp.

Se presenta el ciclo biológico del escarabajo *Phyllophaga* y sus 3 estadios larvarios. Adaptado de *Hacia una ganadería sustentable. Estudio de caso, Jilotepec, Veracruz*, por Cruz, R y Huerta C, 2013. Instituto de Ecología A.C. México, 86 pp.

1.1.2.3. Síntomas de los daños provocados por *Phyllophaga* spp

Los síntomas que se presentan en las plantas son marchitez, amarillamiento prematuro y pérdida de vigor, debido al daño provocado en las raíces, reduciendo la capacidad de absorber agua y nutrientes, aumentando la susceptibilidad a enfermedades y estrés (Villares et al., 2016).

1.1.3. Métodos para el manejo de plagas

Existen diferentes métodos para el control de plagas, entre ellos se encuentran los químicos, físicos, biológicos y culturales que al usarse de manera integrada permite un adecuado control y manejo del cultivo (Aguilar et al., 2020).

1.1.3.1. Método de control cultural

Son prácticas que reducen el establecimiento, reproducción, dispersión y supervivencia de las plagas, creando condiciones favorables para el cultivo, por ejemplo: actividades sanitarias, ajuste de fechas de siembra, rotación de cultivos y eliminación de malezas (**Aguilar et al., 2020**).

1.1.3.2. Método control físico

Este control utiliza factores como: calor, frío, humedad, energía y sonido, pero resultan muy costosos, siendo imposibles de usarse para pequeños agricultores o en países pobres, en esta alternativa se usan mantillos, esterilización con vapor al suelo, barreras como pantallas para mantener alejados a los insectos, o el uso de plástico para generar calor sobre los terrenos o solarización (**Aguilar et al., 2020**).

1.1.3.3. Método control químico

En la actualidad el control químico ha ido en aumento debido a que una agricultura tecnificada depende mucho del uso de agroquímicos, los plaguicidas son el método más común en los agricultores debido a su rapidez y efectividad en el control de plagas, enfermedades y malezas, sin embargo, presenta desventajas como complicaciones ambientales, agroecológicas, problemas de resistencia, contaminación ambiental, y en la salud de agricultores intoxicaciones agudas y crónicas (**Aguilar et al., 2020**).

1.1.3.4. Métodos de control biológico

Es la acción antagónica frente a plagas utilizando insectos parásitos, hongos, bacterias, virus y nematodos este control resulta exitoso. (**Delattre et al., 2019**).

1.1.4. Uso de hongos entomopatógenos para control de plagas

El término entomopatógeno hace referencia a aquellos microorganismos que tienen la capacidad de atacar a insectos y usarlos como hospederos para desarrollar su ciclo de vida (Motta & Murcia, 2011). Son un grupo de microorganismos filogenéticamente diversos, heterótrofos, eucariotas, unicelulares o multicelulares, su reproducción es a través de esporas sexuales, asexuales o ambas (Esparza et al., 2018), su modo de acción se divide en la fijación de conidios, germinación, penetración, crecimiento y generación de conidios infecciosos secundarios (Shin et al., 2020). En diferentes investigaciones se han encontrado que existe aproximadamente 800 especies de hongos identificados como patógenos para los insectos, los cuales se clasifican en las divisiones Ascomycota, Zygomycota, Deuteromycota, Oomycota y Chytridiomycota (Mora et al., 2018)

1.1.4.1. *Metarhizium anisopliae*

El género *Metarhizium* se describió por primera vez en el año de 1883 por Sorokin, se caracteriza por ser un microorganismo mesófilo con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C además, *M. anisopliae* asimila muy bien fuentes de carbono orgánico e inorgánico y no necesita requerimientos especiales de carbohidratos (Padilla et al., 2000). *M. anisopliae* presenta micelios blancos que luego cambia a un color verde oliváceo, sus conidióforos son ramificados en forma de candelabro con dos o tres ramas en cada septo, mientras que sus conidios son cilíndricos y ligeramente cónicos en el ápice (Bich et al., 2021)



Figura 3. Características morfológicas de *M. anisopliae*

(A) colonia verde por el haz y amarillento por el envés, (B) conidióforo en forma de candelabro, (C) conidios cilíndricos alargados Fuente: (Zhao et al., 2023)

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *M. anisopliae*

| Taxonomía | |
|-------------------|-------------------------------|
| Reino | Fungí |
| División | Ascomycota |
| Clase | Sordariomycetes |
| Orden | Hypocreales |
| Familia | Clavicipitaceae |
| Género | <i>Metarhizium</i> |
| Especie | <i>anisopliae</i> |
| Nombre científico | <i>Metarhizium anisopliae</i> |

Fuente: (Gandarilla, 2012).

1.1.4.3. Modo de acción de *M. anisopliae*

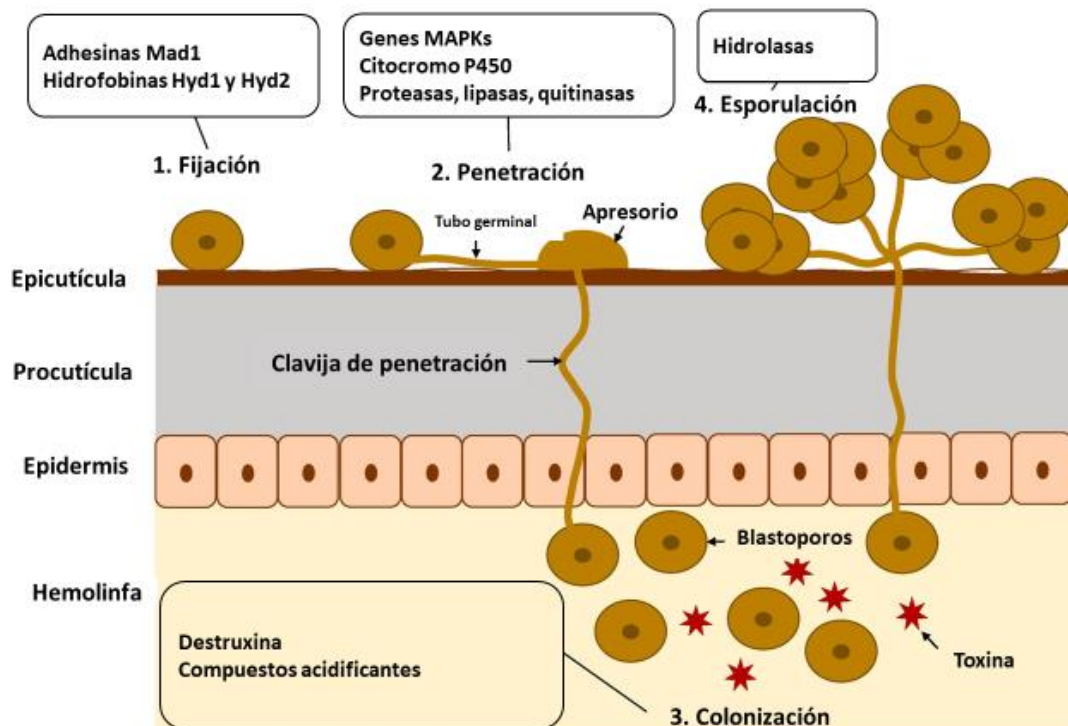


Figura 4. Ciclo de infección del hongo *M. anisopliae*

(1) Fijación de los conidios a la cutícula del insecto, (2) penetración hacia la epicutícula del huésped, (3) colonización permite que los conidióforos vuelven a

romper la cutícula de adentro hacia afuera, (4) esporulación se producen nuevos conidios infecciosos. Adaptado de *Biological control of arthropod pests in protected cropping by employing entomopathogens: Efficiency, production, and safety*, por Smaghe et al., 2023, Biological Control. Copyright © 2023 por Elsevier Inc.

1.1.4.5. Fijación

Comienza cuando un conidio se adhiere a la cutícula de un insecto, esta unión específica está mediada por la proteína Mad1 la cual se encuentra en la superficie de los conidios, para luego formar un tubo germinal y posteriormente el desarrollo de un apresorio el cual es una estructura de infección primaria (**Villamizar et al., 2018**)

1.1.4.6. Penetración

En el proceso de penetración se produce una combinación de enzimas que degradan la epicutícula, aquí actúan proteínas como la quinasa activada por mitógenos (MAPK), luego el apresorio se convierte en una clavija de penetración que permite que los conidios rompan el tegumento del huésped e ingresen a todas las capas del insecto mediante una combinación de presión mecánica y enzimas como el citocromo P450 que implica la β -oxidación de los alcanos que componen la epicutícula, además de proteasas, quitinasas y lipasas necesarias para degradar proteínas, quitinas y lípidos (**Esparza et al., 2018**).

1.1.4.7. Colonización

Como consecuencia de la ruptura de la epicutícula, las hifas fúngicas llegan a la hemolinfa para producir blastosporas, colonizar al hospedero y aprovecharse de sus nutrientes (**Villamizar et al., 2018**), esto mediante proteínas efectoras (proteínas de resistencia) para evadir la respuesta inmune del hospedero, además producen toxinas como la destruxina en el caso de *M.anisopliae*, compuestos acidificantes para tener un mayor actividad de virulencia y provocar la muerte del hospedero (**Smaghe et al., 2023**).

1.1.4.8. Esporulaci3n

Debido a todos los anteriores pasos, el insecto muere y el hongo termina de colonizarlo (Villamizar et al., 2018), los conidi3foros resurgen del cad3ver para esporular, empezar un nuevo ciclo patog3nico y producir nuevos conidios, los blastoporos se revierten, crecen como hifas que rompen la epicut3cula del insecto de adentro hacia afuera y las hidrolasas combinadas con otros factores ya involucrados en la primera rotura permiten la salida de las hifas (Smagghe et al., 2023).

1.1.4.5. *M. anisopliae* como alternativa de biocontrolador

M. anisopliae se merece especial atenci3n debido a que puede infectar una amplia gama de ar3cnidos e insectos hu3spedes que van desde plagas agr3colas hasta vectores de enfermedades humanas (Beys-Da-Silva et al., 2014). Entre las ventajas como biocontrolador se encuentran: desarrollo de cultivos m3s sostenibles, reducci3n del impacto ambiental y eficiencia al tener blancos de acci3n m3s espec3ficos que los productos qu3micos (Gallego et al., 2014). A pesar de los beneficios que presenta este hongo, su eficacia se ve afectada al momento de su aplicaci3n en campo debido a los factores abi3ticos, dificultando la producci3n de conidios infecciosos, es por ello que la adici3n de agentes microencapsulantes a las formulaciones f3ngicas mejoran la eficiencia y persistencia de los conidios, favoreciendo la adhesi3n a la superficie del insecto, aportando mayor termotolerancia, protecci3n contra factores externos y radiaci3n ultravioleta (Barbieri et al., 2023).

1.1.5 T3cnicas de microencapsulaci3n de hongos entomopat3genos

El proceso de microencapsulaci3n consiste en el envasado de materiales s3lidos, l3quidos o gaseosos como material activo con una pel3cula continua como recubrimiento para formar c3psulas de tama3o milim3trico (Ozkn et al., 2019).

Las t3cnicas de microencapsulaci3n se clasifican en 3 m3todos los f3sicos son secado por aspersi3n, liofilizaci3n, precipitaci3n de fluidos supercr3ticos y evaporaci3n de solventes; m3todos fisicoqu3micos como coacervaci3n, liposomas y gelificaci3n

iónica; métodos químicos que incluyen la polimerización interfacial y complejación de inclusión molecular **(da Silva et al., 2022)**.

1.1.5.1 Secado por aspersión

Consiste en la atomización de un líquido en un polvo mediante un inyector que tiene una corriente de gas de secado caliente **(da Silva et al., 2022)**. Se usa materiales como la goma arábica y maltodextrina porque es biocompatible para aplicaciones *in vitro* y es utilizada como transportadora de moléculas bioactivas en el proceso de microencapsulación **(Ozkan et al., 2019)**.

1.1.5.2 Gelificación iónica

Se basa en la capacidad de entrecruzar polielectrolitos en presencia de iones multivalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} y Al^{3+} , por extrusión o gelificación, el principal material que se usa es el alginato formado por ésteres o sales de los ácidos alginicos, la matriz de gel que forma alrededor de las células es biocompatible, no tóxico, barato y rentable **(Ozkan et al., 2019)**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluación de la capacidad antagónica de *Metarhizium anisopliae* microencapsulada frente a *Phyllophaga spp.*

1.2.2. Objetivos Especificos

- Capturar a *Phyllophaga spp.* en estado larvario presentes en cultivo de mora de Castilla.
- Obtener microcápsulas de conidios de *Metarhizium anisopliae* mediante secado por aspersión y gelificación iónica.
- Comprobar la capacidad antagónica de microcápsulas de *Metarhizium anisopliae* frente a *Phyllophaga spp.* en pruebas *in vitro*.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis Nula

El tipo de microencapsulación y la concentración de conidios de *Metarhizium anisopliae* no influyen en el control de *Phyllophaga spp.*

1.3.2. Hipótesis Alternativa

El tipo de microencapsulación y concentración de conidios de *Metarhizium anisopliae* influyen en el control de *Phyllophaga spp.*

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Los materiales que se usaron durante el desarrollo de la presente investigación se presentan a continuación:

Tabla 5. Materiales de laboratorio usados.

| Equipos de laboratorio | Reactivos | Material fungible |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Balanza analítica• Mini Spray Dryer• Microscopio óptico• Cámara de flujo laminar• Autoclave• Incubadora• Refrigerador | <ul style="list-style-type: none">• Agar Papa Dextrosa (PDA)• Agua destilada• Etanol 70%• Etanol 90%• Gentamicina• Maltodextrina• Alginato de Sodio• Cloruro de Calcio• Azul de lactofenol | <ul style="list-style-type: none">• Probetas• Botellas tapa rosca (BOECO)• Vasos de precipitación• Aguja de inoculación• Matraces Erlenmeyer• Cajas de Petri• Mechero de alcohol• Gradilla• Espátula• Portaobjetos• Cubreobjetos• Cajas de plástico |

Fuente: Elaboración propia

2.2. Métodos

2.2.1. Captura de *Phyllophaga spp* a partir de mora

2.2.1.1. Muestreo de *Phyllophaga spp*

Al ser *Phyllophaga spp* una larva de escarabajo se considera fauna silvestre, razón por la que se procedió a realizar el trámite de aprobación de Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) para la recolección de las larvas (*Anexo 14*).

Se eligió plantas cuya sintomatología sea marchitez y amarillamiento provocado por la larva de *Phyllophaga spp.*, el muestreo fue aleatorio simple en zigzag en la propiedad del señor Alberto Guevara, productor de mora de Castilla.

2.2.1.2. Trampeo y recolección de la muestra

Se realizaron trampas con materia orgánica y melaza, las trampas fueron ubicadas alrededor de las plantas de manera superficial durante 8 días con el fin de atraer a las larvas.

Para su recolección se identificaron larvas que tuvieran un tamaño promedio de entre 1.5 a 2 cm correspondientes al segundo estadio, se colocaron en botes de plástico de 4 litros de capacidad, con 1 kg de suelo estéril, humedad del 40% y temperatura promedio de 26°C, condiciones apropiadas para evitar su muerte por inanición (**Alvarez, 2009**).

2.2.2. Microencapsulación de conidios de *Metarhizium anisopliae*

2.2.2.1. Obtención de la materia prima

Se usó la cepa de *Metarhizium anisopliae* donada por la PhD. Ana Lucia Bravo del departamento de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito (*Anexo 1*)

2.2.2.2. Multiplicación de *Metarhizium anisopliae*

Se inoculó la cepa en placas de Petri que contenían agar de Papa Dextrosa (PDA) más 125 ppm de gentamicina para evitar contaminación bacteriana, se incubó a 28°C durante 5 días hasta que presente esporulación densa. Luego se realizaron subcultivos donde se cortaron discos de 1 cm de diámetro desde el centro hasta el borde de la caja, los discos se transfirieron a 20 placas de Petri con PDA, con el fin de prolongar la recuperación y el vigor de crecimiento del hongo (**Rodrigues et al., 2017**)

2.2.2.3. Recolección de conidios

Se realizó una solución de suspensión de los conidios, donde se añadió 10 ml de agua destilada estéril y 50 µl de Tween 80 a una concentración de 0.1% a las placas de *M. anisopliae*, y se raspó el micelio con un pincel para desprender las estructuras (**Valle et al., 2021**). La suspensión fue filtrada con una gasa estéril para separar el micelio y obtener la suspensión de conidios que fue recogida en botellas estériles. Finalmente se agitó a 10.000 rpm por 10 minutos y se recogió el pellet para el proceso de microencapsulación (**Valle et al., 2021**).

Para la cuantificación de conidios se realizó soluciones madre de aquellas cajas donde la esporulación había sido completa, el conteo de los conidios fue en la cámara de Neubauer para obtener las concentraciones de 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 .

2.2.2.4. Microencapsulación de *Metarhizium anisopliae* mediante secado por aspersión.

Se llevó a cabo una solución acuosa de (20% p/v) de goma arábiga, maltodextrina y una suspensión de conidios al (1% p/v) y se mezcló en 500 ml de agua destilada estéril. El proceso de microencapsulación se realizó mediante el equipo Mini Spray Dryer de Buchi-B290, cuyo caudal de aspiración fue del 100%, la suspensión de 500 ml fue alimentada con una temperatura de entrada de 150 °C mientras que la de salida fue de

90 °C, una vez finalizado el proceso de secado las microcápsulas fueron recogidas y almacenadas a 4°C hasta su uso (Jin & Custis, 2011).

2.2.2.5. Microencapsulación de *Metarhizium anisopliae* mediante gelificación iónica.

Se preparo una solución de alginato de sodio de 20 g L⁻¹ por solubilización en agua desionizada a 60°C, la mezcla se mantuvo en constante agitación hasta completar la solubilización del alginato. La solución se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C, un volumen de 100 ml del cultivo de *M. anisopliae* se concentraron por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. Las células se suspendieron en 100 ml de la solución de alginato de sodio, la matriz de alginato con los hongos se polimerizó en una solución de CaCl₂ 0.1 M gota a gota bajo agitación durante 30 minutos, las perlas se recuperaron en un tamiz y se enjuagaron con agua destilada estéril y finalmente conservadas a 4°C (Pérez et al., 2023).

2.2.2.6. Evaluación de la viabilidad de los microencapsulados.

Se sembró 1 alícuota de 5 μ l de la suspensión de conidios microencapsulados de *M. anisopliae* con una concentración de 1x10⁹ conidios/g en medio PDA, se incubarán a 28°C durante 24 horas, luego se agregó azul de lactofenol para detener la germinación y distribuirlo uniformemente, se cortó la porción del agar que contiene la alícuota de la suspensión de conidios y se colocó en un portaobjetos y se registró los resultados (conidios germinados/ conidios no germinados)* 100 (Baldiviezo et al., 2023).




2.2.3. Demostración de la capacidad antagónica de las microcápsulas de *M. anisopliae* frente a *Phyllophaga spp.*

2.2.3.1 Pruebas *in vitro* entre *M. anisopliae* y *Phyllophaga spp.*

Se desinfectó las larvas con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 min, se colocó las larvas individualmente en recipientes plásticos estériles de 100 ml, a todas las unidades

experimentales se les alimentó con una dieta a base de zanahoria para evitar la muerte de las larvas por inanición, luego se infectó a las larvas de *Phyllophaga spp* con 1 mg de los microcápsulados de *M. anisopliae*, para los tratamientos testigos se usaron los conidios de *M. anisopliae* sin microencapsular, se mantuvo los recipientes a temperatura ambiente, humedad relativa 30-50% y finalmente el nivel de micoparasitismo se evaluó con una escala de severidad de infección (Tabla 6) los resultados se registraron una vez al día durante 7 días.

Tabla 6. Escala de severidad de la infección ocasionada por *M. anisopliae* en larvas de segundo estadio de *Phyllophaga spp*.

| Clase | Imagen | Descripción |
|-------|---|--|
| 0 |  | Insectos vivo o muerto, sin síntomas |
| 1 |  | Con síntomas del hongo solo en una parte del cuerpo |
| 2 |  | Con síntomas del hongo en patas, raster y aparato bucal en forma de puntos |

3



Con síntomas del hongo en patas, raster y aparato bucal, y el abdomen distribuido en el insecto.

4



Con síntomas del hongo en todas las partes del cuerpo de manera abundante, la mayor parte es micelio (forma algodonosa de color verde)

5



Con síntomas del hongo en todas las partes del cuerpo de manera abundante, la mayor parte es conidios (aparición polvorienta color verde)

Fuente: (Ramos, 2015)

2.2.3.2. Cálculo del porcentaje de efectividad biológica.

La efectividad biológica se evaluó en términos de la capacidad que tiene el hongo para infectar a la larva es por ello que se evaluó en base a la cantidad de larvas infectadas.

$$\% EB = \left(\frac{T_t - T_i}{T_t} \right) * 100$$

Donde

$\% EB$ = es la efectividad biológica del micoparasitismo expresada en porcentaje.

T_t = es el número de individuos en el tratamiento testigo.

T_i = es el número de individuos en el tratamiento i

(Alcantara et al., 2020).

2.2.3.3. Estimación de tiempo de muerte larvaria

Para el cálculo de estimación de muerte larvaria se utilizó la siguiente fórmula.

$$Y = (100 - S) * e^{-k(t-t_0)} + S, \text{ para } t > t_0$$

Donde

Y = porcentaje de sobrevivencia (%) al tiempo t

k = es la tasa de muerte (d^{-1})

t₀ = es el tiempo para el primer muerto (d)

S = es la sobrevivencia asintótica (%)

(Alcantara et al., 2020).

2.2.3.4. Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completo al azar axb con tres repeticiones por tratamiento, el factor A: el tipo de encapsulación y el factor B la concentración conidial. Se utilizó un ANOVA para comparar diferencias significativas y obtener el porcentaje de micoparasitismo en la larva, el porcentaje de efectividad biológica y la estimación de la muerte larvaria, el análisis de datos estuvo dado por el software Jamovi, aplicando una prueba Tukey al 5% **(Alcantara et al., 2020).**

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados.

3.1.1. Muestreo y captura de *Phyllophaga spp* en estado larvario a partir de mora de Castilla.

En las plantas de mora de Castilla seleccionadas en el muestreo se observó marchitez con áreas de color marrón en las hojas, raíces con mordeduras y necrosis como resultado del daño radicular provocado por el ataque de larvas de *Phyllophaga spp* Fig. 5B y 5C, Villares et al (2016), menciona que a simple vista esta sintomatología puede ser confundida con la marchitez por sequía, pero su diferencia radica en que la sequía afecta a toda la planta de manera uniforme, las hojas pierden turgencia se vuelven de color amarillo, quebradizas y se encogen para minimizar la pérdida de agua (Agrios, 2005).

Mientras que en un ataque por plagas, el daño se da en sitios más específicos (raíz) y se puede observar signos como la presencia de larvas alrededor de las plantas, en el caso de *Phyllophaga spp* sus mordeduras permiten la entrada a patógenos fúngicos como *Fusarium* que provoca el enanismo y clorosis de las hojas, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* que son agentes causales de la pudrición radical con un marchitamiento progresivo de las plantas estos ataques dejan como resultado un desarrollo deficiente en plantas grandes Fig. 5A y la muerte en plantas pequeñas (Montero et al., 2013).



Figura 5. Muestreo de plantas de mora con sintomatología de *Phyllophaga spp*.

Para lograr la captura de las larvas se utilizó materia orgánica y melaza basada en un método de control conocido como trampeo (*Anexo 1*), la melaza genera olores dulces y junto con la materia orgánica atrae a las larvas, **Sanclemente et al., (2011)** en su estudio denominado ‘Evaluación de atrayentes orgánicos para la captura de adultos de *Opsiphanes cassina felder*, defoliador de la palma aceitera’, afirma que la melaza es un acelerador en la descomposición de la materia orgánica y concuerda que al mezclarse estos generan olores provenientes de la glucosa, fructosa, ácido cítrico, málico y láctico, además este método es muy eficiente en el trapeo de insectos y larvas, siendo fácil de adquirir, económico y amigable con el ambiente.

En los puntos de muestreo de cada planta se logró obtener entre 4 a 6 larvas por planta de primero, segundo y tercer estadio respectivamente (*Anexo 2*), **Katovich, 2012** en su manual sobre el manejo de gallinas ciegas menciona que la presencia de 4 larvas por metro cuadrado ya es considerado como un factor crítico, del muestreo se escogió larvas correspondientes al segundo estadio para la realización del estudio, se tomó las larvas en esta etapa debido a que es cuando comienzan a generar daños en las raíces de las plantas.

En el estudio sobre la ‘Estimación de consumo de raíces y daños causados por larvas de *Phyllophaga capillata* y *Aegopsis bolboceridus* (Coleóptera, Melolonthidae) en soja y maíz en el centro de Brasil ‘ **Oliveira y Frizzas, (2021)** concuerda que las larvas de segundo estadio son aquellas que empiezan a mostrar daños progresivos en el sistema radicular, determino que el consumo de raíces por parte de las larvas de primer estadio fue relativamente bajo de 5,76 % con una densidad larvaria superior a 6, en relación a las larvas de segundo estadio que redujeron el sistema radicular en un 60% a una densidad de 4, 6, 8 y 10 larvas/ planta.



3.1.1.1. Identificación de las larvas de *Phyllophaga spp.*

Para la identificación se tomó en cuenta criterios como los de **Morón et al., (2016)** donde afirma que no todas las especies de gallinas ciegas causan daños a las plantas,

algunas especies comen restos vegetales y benefician al suelo con sus movimientos ayudando a la circulación de agua, aire y partículas entre las raíces. **Plantwise (2020)** con cuerda que, dependiendo de los hábitos de alimentación, esta especie se separa en tres grupos: gallinas ciegas rizófagas (*Phyllophaga*) que consumen únicamente las raíces de las plantas, gallinas ciegas saprófagas (*Cyclocephala*) se alimentan de materia orgánica en descomposición y gallinas ciegas facultativas (*Cotinis*) se alimentan de raíces con escasa materia orgánica.

La identificación de las larvas recolectadas se realizó con un análisis morfológico de manera macroscópica bajo un estereoscopio y los resultados en se muestran en la **Tabla 7.**

Tabla 7. *Identificación morfológica de larvas de Phyllophaga spp.*

| Parte | Imagen | Descripción |
|--------------------|---|---|
| Cuerpo |  | Cuerpo completo de color gris oscuro, de tipo C escarabaeiforme. |
| Mandíbula y cabeza |  | Cabeza marrón de 4-5 mm de ancho, con mandíbulas bien desarrolladas |

Antenas



Dos antenas a cada extremo de la cabeza en color café de 3-4 mm de largo con 4 artejos cada una.

Patas



Tres pares de patas las primeras de 4-5 mm, las segundas de 5-6 y el tercer par de 6-8 mm de largo todas con presencia de vellosidades.

Raster



Raster en forma de "Y"

Fuente: Elaboración propia

Katovich, (2012) menciona que la familia Scarabaeidae es muy diversa en los cultivos por lo que las larvas de *Phyllophaga spp* fácilmente se pueden confundir con el género *Cyclocephala sp*.

En la Tabla 7 muestra que el color del cuerpo de *Phyllophaga spp* presenta un color gris oscuro, mientras que *Cyclocephala sp* suele mantener un color más uniforme en

tonos crema más claro, la cabeza tiene un color rojizo a marrón con un tamaño de 4-5 mm, mientras que *Cyclocephala sp* tiene una cabeza más pequeña de color amarillo pardo y sus mandíbulas son más pequeñas, las antenas de *Phyllophaga spp* son cortas y no se extienden más allá de la longitud de su cuerpo a diferencia de las antenas de *Cyclocephala sp* que son largas y si se extienden más allá de la longitud de su cuerpo, las patas de *Phyllophaga* son largas con tamaños promedios de 4-5 mm para las pequeñas, 5-6mm para las medias y 6-8 mm para las grandes mientras las de *Cyclocephala* tienen a ser más reducidas, finalmente el raster es considerado como la principal característica para la identificación debido a que *Phyllophaga* tiene un raster con una palidia en forma de ‘‘Y’’, mientras que *Cyclocephala sp* tiene un raster transversal arqueado sin palidia.

Morocho., et al (2020) realizó un estudio sobre la ‘‘Presencia de *Phyllophaga spp.* (Coleóptera: Scarabaeidae) y hongos entomopatógenos potenciales para su control biológico en sistemas agrícolas de Saraguro (Loja, Ecuador)’’ donde recolectó especies de *Phyllophaga spp* de varios cultivos y obtuvo larvas con características similares a las encontradas en este estudio como una cabeza café de 6 mm de ancho, antenas café de 4 mm de largo con 4 artejos mandíbulas de 4 mm de longitud fuertemente desarrolladas, tres pares de patas las primeras de 6 mm, las secundarias de 7 mm y las más largas de 9 mm de largo de igual forma encontró que sus regiones anales presentaban una hendidura y la presencia de una palidia en forma de ‘‘Y’’ por lo que se puede comparar y afirmar que las larvas encontradas en este estudio corresponden al género de *Phyllophaga*.

3.1.2. Producción y microencapsulación de conidios de *M. anisopliae* mediante secado por aspersión y gelificación iónica.

3.1.2.1 Producción de conidios de *M. anisopliae*

La siembra y producción de conidios se realizó mediante cultivo *in vitro* en cajas de Petri, así mismo se corroboró la cepa donada mediante identificación macro y microscópica donde se observó que el medio del cultivo presentó en los primeros días

de incubación una tonalidad blanquecina que fue tornándose verde oliváceo en los días posteriores conforme iba madurando el hongo como se observa en la figura Fig. 6A, mientras que en el anverso de la colonia presento una tonalidad entre crema y amarilla Fig. 6B, el conidióforo fue alargado y tabicado con presencia de fiálides, mientras que los conidios presentaron una estructura cilíndrica con formación de cadenas Fig. 6C.

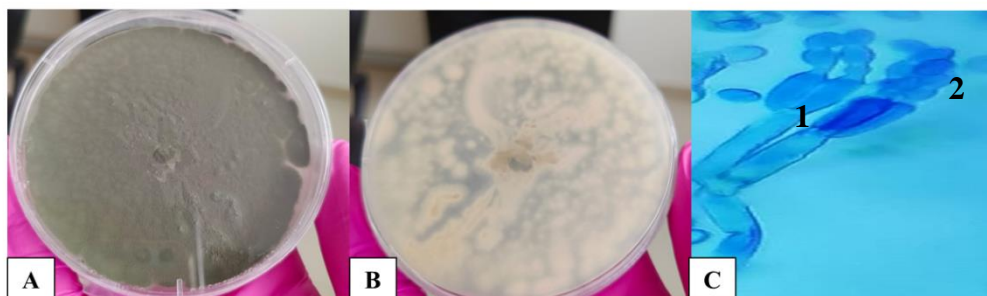


Figura 6. Siembra en cajas de Petri de *M. anisopliae*
A) Verso de cultivo, B) Anverso del cultivo, C) C1. Conidióforo y C2 conidios

Los resultados en esta investigación concuerdan con los realizados por **Torres de la C. et al., (2013)** en su trabajo de la “Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México” donde el micelio en su etapa inicial mostró un color blanco y al madurar tornaron un color verde olivo con conidióforos simples con fiálides y reporto conidios con un tamaño aproximado de 6 a 8 μm de largo y de 2 a 3 μm de ancho.

Se escogió el método de siembra *in vitro* para proporcionar una ambiente estéril y controlado para lograr un óptimo desarrollo del hongo, si bien es cierto que también se puede usar otro tipo de métodos como la fermentación en sólido o líquido, estos pueden llegar a presentar desventajas debido a la susceptibilidad a contaminación bacteriana disminuyendo la tasa de esporulación, además estos cultivos son muy útiles cuando se necesita una gran cantidad de producción conidial (**Barajas et al., 2010**). Para las concentraciones de 10^5 , 10^7 , 10^9 se realizaron conteos en la cámara de Neubauer (*Anexo 4*) donde se obtuvo 1.3×10^5 , 1.4×10^7 , 1.4×10^9 para posterior a ello ser llevado a proceso de microencapsulación.

3.1.2.2 Encapsulación

Una vez realizado los procesos de encapsulación el rendimiento del secado por aspersión arrojó un rendimiento del 26.08 % Tabla 8, el porcentaje para el secado por aspersión fue bajo. **Aita et al., (2022)** en su investigación sobre el "Polvo secado por aspersión que contiene quitina y β -1,3-glucanasa con actividad insecticida contra *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae)" menciona que los rangos de 20 a 60 % se consideran comunes para los secadores por aspersión a escala de laboratorio cuando existe rendimientos inferiores al 15 % se considera un ineficiente debido a factores como el escape de partículas en el aire o bloqueos en la tobera.

Mientras que el rendimiento obtenido para las cápsulas de gelificación iónica fue del 86.04 % esto debido a que el proceso fue realizado de manera manual evitando cualquier tipo de pérdida que afecte al rendimiento de las capsulas, además de que este métodos no emplea altas temperaturas, ni disolventes orgánicos que afecten la calidad de los conidios (**Ortiz et al., 2021**).

Tabla 8. Componentes de microencapsulación de conidios para el secado por aspersión.

| Componente | Cantidad |
|----------------------|----------|
| Goma arábica | 14.7 g |
| Maltodextrina | 34.3 g |
| Agua | 167 ml |
| Solución de conidios | 10 ml |

Tabla 9. Componentes para la encapsulación de conidios en alginato de sodio y cloruro de calcio.

| Componente | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Alginato de sodio | 1g |
| Cloruro de calcio | 10 ml |

| | |
|----------------------|-------|
| Solución de conidios | 10 ml |
|----------------------|-------|

Tabla 10. *Rendimiento de los procesos de encapsulación.*

| Técnica | Rendimiento |
|----------------------|--------------------|
| Secado por aspersión | 26.08 % |
| Gelificación iónica | 86.04% |

Porcentaje de viabilidad de conidios microencapsulados.

Tabla 11. *Porcentaje de viabilidad de conidios después del secado por aspersión.*

| Concentración conidios/ g | % germinación | Promedio |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1,3x10 ⁵ | 37.05% | |
| 1,4x10 ⁷ | 48,92% | |
| 1,4x10 ⁹ | 57,94 % | 47,97 % |

Tabla 12. *Porcentaje de viabilidad de conidios después de la gelificación iónica.*

| Concentración conidios/ g | % germinación | Promedio |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|
| 1,3x10 ⁵ | 94.14 % | |
| 1,4x10 ⁷ | 94.13 % | |
| 1,4x10 ⁹ | 94.61 % | 94.29 % |

Durante la evaluación de la viabilidad Tabla 8 y 9 se determinó que la germinación mediante secado por aspersión obtuvo un promedio de germinación de 47,97 %, esto debido a que durante el proceso de secado y atomización las partículas se reducen en tamaño por la evaporación del solvente, donde la velocidad y energía invertida puede

fragmentar los conidios mostrando una disminución en su porcentaje de germinación y tubos germinativos reducidos.

La germinación por gelificación iónica obtuvo un porcentaje de viabilidad de 94.29 %, este método ofrece una protección más controlada y una matriz más estable manteniendo a los conidios sin fragmentación a comparación del secado por aspersión, diferencias que incluyen la interacción con los materiales y condiciones involucradas, además **Perdonomo et al., (2021)** menciona que el límite mínimo de germinación establecido para lograr que una formulación a base hongos actúe rápidamente en campo es del 85 % siendo el de gelificación iónica el que cumple con el límite.

3.1.3. Evaluación de las pruebas *in vitro* de las microcápsulas de *M. anisopliae* frente a *Phyllophaga spp.*

Tabla 13. Factores en estudio.

| Tipos de microencapsulación | Factor de concentración conidial |
|------------------------------------|---|
| SA: Secado por aspersión | C1: 1,4X10 ⁵ |
| GI: Gelificación iónica | C2: 1,4X10 ⁷ |
| SM: Sin microencapsular | C3: 1,4X10 ⁹ |

Tabla 14. Codificación de los tratamientos.

| Tratamientos | Codificación |
|---------------------|---------------------|
| T1 | C1SM |
| T2 | C2SM |
| T3 | C3SM |
| T4 | C1SA |
| T5 | C2SA |
| T6 | C3SA |
| T7 | C1GI |
| T8 | C2GI |
| T9 | C3GI |

Tabla 15. Información para el análisis estadístico.

| Información para el análisis estadístico | |
|--|--------------------------------|
| Cantidad de tratamientos | 9 tratamientos |
| Número de repeticiones | 3 repeticiones por tratamiento |
| Días de evaluación | 7 días |

Una vez obtenido los encapsulados, la infección se llevó a cabo en 10 larvas usando 1 mg por larva por tratamiento (*Anexo 9*) y esto por triplicado.

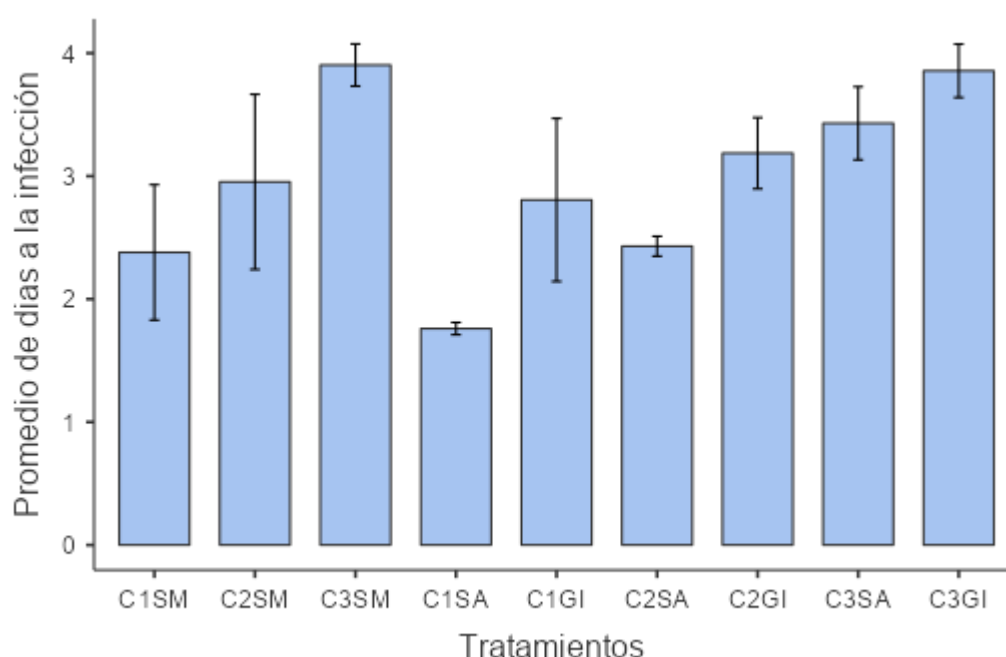


Figura 7. Promedio de las medias de acuerdo con los días de infección.

Nota. En la fig. 7 se representa el promedio de larvas infectadas durante los 7 días de evaluación.

En la fig. 7 se observa los días a la infección en relación a los tratamientos, es importante indicar que al día 1 no se presentaron larvas infectadas, al día 2 se evidencia la presencia de pequeñas pústulas en diferentes áreas del cuerpo de la larva, al día 4 se evidencia incidencia notoria para los tratamientos C3SM con un promedio de 5 larvas infectadas y el 70 % de individuos infectados al día 7, seguido del tratamiento C3GI

con 4,3 promedio de número de larvas infectadas con un 76% de individuos infectados al día 7, el tratamiento C3SA presenta un promedio de 3,66 de larvas infectadas, y 60% de larvas infectadas al día 7, considerando a estos tratamientos como los mejores, finalmente el tratamiento C1SA es considerado el menos eficiente con un promedio de 3,6 a los 7 días equivalente a un porcentaje del 36%, los conidios sin microencapsular y gelificación iónica tuvieron mejores resultados debido a que no sufrieron daños por shocks térmicos, los tubos germinativos de las capsulas de gelificación iónica fueron más grandes a diferencias de los resultados de secado por aspersión.

Estos resultados se compararon con los obtenidos por **Shah et al., (2022)** donde concuerda que la mayor tasa de infección fue a los cuatro días después de la inoculación con encapsulados de alginato y menciona que las condiciones ambientales del laboratorio como la humedad y la temperatura influyen en la esporulación de los conidios.

La menor tasa de infección en los tratamientos de secado por aspersión pudo deberse al estrés térmico que sufrieron los conidios durante el proceso de secado, donde se utilizó una temperatura de entrada de 150 °C y 90 °C de salida, el calor produce daños en la membrana plasmática que está relacionado con la muerte celular por lo que fácilmente causa que los conidios pierdan su viabilidad o mueran (**Fernández et al., 2012**).

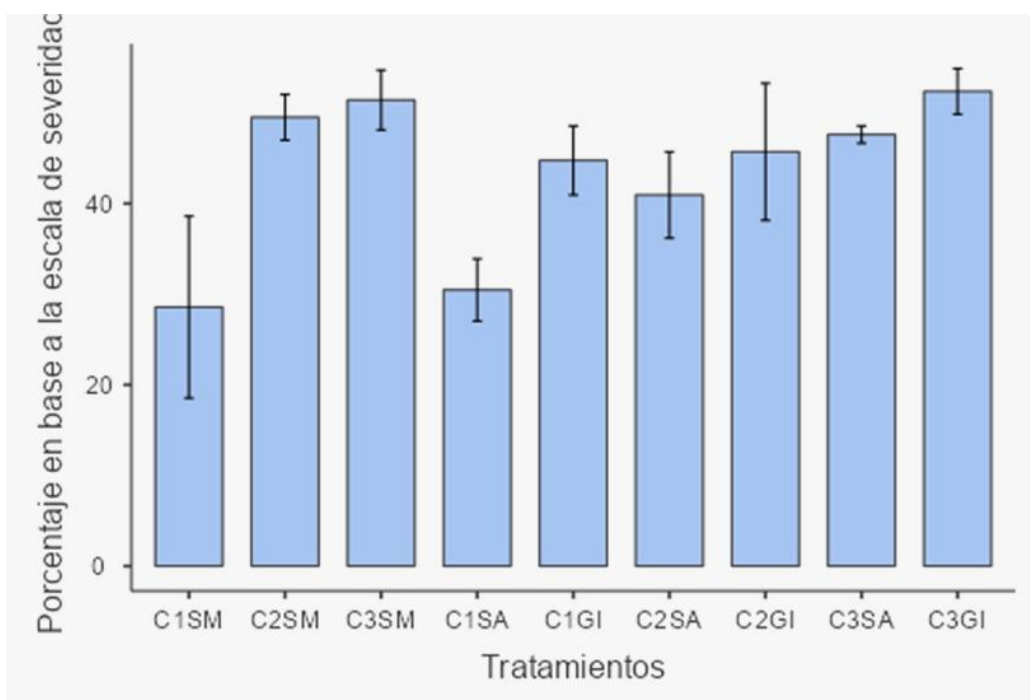


Figura 8. Promedio de las medias de acuerdo con el porcentaje de severidad.

Nota. En la fig. 8 representa el porcentaje de severidad de la infección de *M. anisopliae* frente a *Phyllophaga spp* durante los 7 días de evaluación resultando el mejor tratamiento encapsulado el de C3GI.

El porcentaje de severidad de infección de los encapsulados hacia las larvas se evaluó utilizando una escala de severidad con base a la cantidad de infección que presentó el cuerpo de la larva durante los 7 días de evaluación (Tabla 6), donde 0 representa 0 % de infección, 1 el 20 %, 2 el 40 %, 3 el 60 %, 4 el 80 % y 5 el 100 % (**Ramos, 2015**).

En la Fig. 8 se puede apreciar los resultados de los bioensayos con las formulaciones encapsuladas donde el tratamiento con mejor porcentaje de severidad es el C3GI 52,38 seguido, C3SM CON 51,28 % y C3SA 44,76 %. .Esto debido a que el en tratamiento de CGI fue el primero que presentó los síntomas típicos de infección por hongos en las larvas como la inactividad de movimiento, disminución en la alimentación y pequeñas protuberancias en el dorso evidenciando su capacidad de infección en el día 4 (Anexo 12) (**Acuña et al., 2015**)

Tabla 16. *Tabla de efectividad biológica de los tratamientos en relación con el control.*

| Tratamientos | Efectividad Biológica |
|---------------------|------------------------------|
| C1SA | 36 % |
| C2SA | 53 % |
| C3SA | 66 % |
| C1GI | 53% |
| C2GI | 63 % |
| C3GI | 76 % |

El porcentaje de efectividad biológica obtenido (Tabla 16) el tratamiento C3GI es aquel que presenta mayor efectividad con un 76 % mientras que el menor porcentaje es del tratamiento C1SA con 36 %. La pérdida de efectividad biológica puede ser por la respuesta inmunológica de las larvas, así lo confirma **Pedrini et al., (2013)** en su estudio sobre los "Lípidos epicuticulares de insectos por el hongo entomopatógeno *Bauveria bassiana*: oxidación de hidrocarburos en el contexto de una interacción huésped-patógeno", donde menciona que los insectos tiene la capacidad de producir hidrocarburos de cadenas más largas como alcanos y una alta cantidad de lípidos epicuticulares que los hongos entomopatógenos no pueden asimilar.

La susceptibilidad de infección también está relacionada con la etapa de desarrollo en la se encuentra la larva debido a que los hidrocarburos y lípidos que se encuentran en la capa epitelial varía entre etapas, en esta investigación se escogió larvas que tengan características similares correspondientes al segundo estadio, pero sería necesario un estudio más exhaustivo sobre este estadio y esto podría explicar la variación de infección que se encontró.

De acuerdo con la fórmula utilizada, la estimación de muerte larvaria resultaría ser a los 17 días (Anexo 13) después de la inoculación, esta estimación puede estar sujeta a cambios debido a que algunas larvas no se infectaron o la capacidad de infección fue muy bajo, por factores adaptativos, selección natural, desarrollo de resistencia genética, comportamientos defensivos, las larvas activan comportamientos de limpieza del cuerpo para tratar de eliminar las esporas del hongo, producción de

metabolitos antifúngicos y su capacidad de resistir condiciones adversas como, el estrés ambiental del suelo (Sarma et al., 2023).

3.1.4. Análisis estadístico

Tabla 17. ANOVA de días a la infección y porcentaje de severidad

ANOVA

ANOVA - Promedio Días a la Infección

| | Suma de Cuadrados | gl | Media Cuadrática | F | p | η^2 |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|-------|----------|
| Tratamientos | 12.14 | 8 | 1.517 | 3.02 | 0.024 | 0.573 |
| Residuos | 9.04 | 18 | 0.502 | | | |

ANOVA

ANOVA - Porcentaje de Severidad de la Infección

| | Suma de Cuadrados | gl | Media Cuadrática | F | p | η^2 |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|-------|----------|
| Tratamientos | 2018 | 8 | 252.3 | 3.32 | 0.016 | 0.596 |
| Residuos | 1369 | 18 | 76.0 | | | |

En el análisis estadístico se realizó la prueba de Shapiro Wilk donde se evidencia que los datos están distribuidos de manera normal, en los días a la infección se obtuvo que $p 0,024 < 0.050$ de igual forma de acuerdo con el análisis Tukey (Anexo 13. Tabla 8), mientras que el porcentaje de severidad de la infección en las larvas donde p es $0,016 < 0,050$ y mediante la tabla resumen Tukey (Anexo 13. Tabla 12) se evidencia mayoritariamente el rechazo de la hipótesis nula (H_0) referente al promedio de días analizados a la infección y el porcentaje de severidad de la infección en las larvas, respaldando la validez de la hipótesis alternativa, por ello se logró identificar que a una concentración de conidios de 1×10^9 en formulaciones encapsuladas con alginato sódico son efectivas en el control de *Phyllophaga spp*, sin embargo se pueden seguir realizando estudios sobre la eficacia en campo para proporcionar resultados más robustos.

3.2. Verificación de hipótesis

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

H_a = Se acepta la hipótesis alternativa, se concluye que el tipo de microencapsulación de conidios *M. anisopliae*, así como la concentración si influye en el control de *Phyllophaga spp.*

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Las plantas de mora de castilla presentaron síntomas de marchitez con áreas de color marrón en las hojas, raíces con mordeduras y necrosis, con una densidad larvaria de 4-6 larvas/ planta, las larvas tuvieron un cuerpo en forma de C de color gris oscuro, una cabeza de 4-5 mm de ancho con de color marrón, dos antenas a cada lado de la cabeza de 3-4 mm de largo con 4 artejos, tres pares de patas de pequeñas 4-5 mm, medias 5-6 mm y grandes 6-8 mm y un raster en forma de “Y” relacionado con el género *Phyllophaga spp.*
- En los procesos de encapsulación en el secado por aspersión con los polímeros encapsulantes maltodextrina y goma arábica se obtuvo un rendimiento del 26,08 %, mientras que por gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio arrojó un rendimiento del 86.04 %, el porcentaje de viabilidad de los conidios fue en promedio de 47.97 % para el secado por aspersión y 94.29 % para la gelificación iónica.
- Con relación a las pruebas *in vitro* en los 7 días de evaluación, el tratamiento que presento mejor porcentaje de control para *Phyllophaga spp* fue el de gelificación iónica C3GI con una concentración de $1,4 \times 10^9$ con 4 días a la infección, mientras que en el porcentaje de severidad los mejores tratamientos fueron para la gelificación iónica C3GI con 52,38 % y para el secado por aspersión C3SA con 46,76 %.

4.2. Recomendaciones

- Utilizar un método de trapeo basado en el uso de feromonas sintéticas que sirven para atraer las larvas, las feromonas imitan las señales químicas que las larvas utilizan para comunicarse aumentando la eficiencia de las trampas.
- Realizar pruebas de estabilidad de los microcápsulados bajo diferentes condiciones como temperatura, humedad y pH.
- Evaluar los mejores tratamientos obtenidos en esta investigación frente a otro hongo entomopatógeno e insecticida sintético comercial, con el fin de medir el nivel de toxicidad y resistencia de la larva.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Acuña, García, C., Rosas, N., López, M., & Saíz, J. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (metschnikoff) sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (fabricius). *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 31(3), 219–226.
- Acuña, R., Brenes, J., Acuña, R., & Brenes, J. (2020). Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga* sp.). *Revista Tecnología En Marcha*, 33(4), 140–154. <https://doi.org/10.18845/TM.V33I4.4376>
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology - George N. Agrios - Google Libros*. https://books.google.com.ec/books?id=CnzbGZgby60C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Aguilar, L., Mendozas, P., Al-Ani, L., López, M., Gómez, O., Villar, E., & Reyes, D. (2020). Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 333–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00027-4>
- Alcantara, E., Espitia, J., Garza, P. M., Angel, A., Alcantara, E., Espitia, J., Garza, P. M., & Angel, A. (2020). Producción y calidad de conidios de cepas de entomopatógenos del género *Metarhizium anisopliae*, aislados en zonas agrícolas del Estado de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91. <https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2020.91.2912>
- Alvarez, M. (2009). *Actividad biológica de extractos vegetales en Phyllophaga ravidia y P. obsoleta (Coleoptera: Melolonthidae)*.
- Baldiviezo, L., Nieva, B., Pedrini, N., & Cardozo, M. (2023). Microencapsulation of a native strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and bioinsecticide Activity against pyrethroid-resistant *Triatoma infestans* to vector control of chagas disease in the Argentine Gran Chaco Region. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050245>
- Barajas, C., Pozo, E., García, I., & Méndez, A. (2010). *Obtención de conidios del*

aislamiento Ma-002 de Metarhizium anisopliae (METSH) sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. 25(3), 174–180.

- Barbieri, A., Rico, I. B., Silveira, C., Feltrin, C., Dall'agnol, B., Schrank, A., Lozina, L., Klafke, G. M., & Reck, J. (2023). Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. *Ticks and Tick-Borne Diseases, 14(3)*, 102147. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2023.102147>
- Beys-Da-Silva, W., Santi, L., Berger, M., Calzolari, D., Passos, O., Guimarães, A., Moresco, J., & Yates, R. (2014). Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. *Journal of Proteome Research, 13(5)*, 2282. <https://doi.org/10.1021/PR401204Y>
- Bich, G., Castrillo, M., Kramer, F., Villalba, L., & Zapat, P. (2021). Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops. *floresta e ambiente, 28(2)*, e20180086. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2018-0086>
- Cevallos, L. (2020). Manejo agronómico del cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*). *Tesis previa a la obtención del Grado de tecnólogo Agrícola. Universidad Agraria Del Ecuador.*, 60. http://www.uagraria.edu.ec/carrera_medicina_veterinaria.php
- Chirinos, D., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Bravo, S., Solis, L., & Geraud, F. (2020). Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador. *Ciencia Tecnologia Agropecuaria, 21(1)*. https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL21_NUM1_ART:1276
- da Silva, L., Castelo, R., Cheng, H., Biswas, A., Furtado, R., & Alves, C. (2022). Methods of microencapsulation of vegetable oil: principles, stability and applications - A Minireview. *Food Technology and Biotechnology, 60(3)*, 308. <https://doi.org/10.17113/FTB.60.03.22.7329>
- Delattre, T., Collard, B., & Lavigne, C. (2019). Keep your enemies closer: Enhancing biological control through individual movement rules to retain natural enemies inside the field. *Web Ecology, 19(1)*, 15–26. <https://doi.org/10.5194/WE-19-15-2019>
- Díaz, A., Galindo, J., Rivero, M., & Leiva, L. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo*

de la mora (Rubus glaucus benth) :medidas para la temporada invernal. 32 p.
<http://hdl.handle.net/20.500.12324/2279>

- Esparza, M., Marcelo, A., & Fraga, M. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84(0), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- Fernández, M., Ortiz, M., Galindo, E., & Serrano, L. (2012). Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochemistry*, 47(2), 186–194. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2011.10.006>
- Franco, G., Bernal, J., Vázquez, L., Saldarriaga, A., Henao, J., Díaz, J., Díaz, A., Aguilera, G., García, M., Argüelles, J., Betancourt, M., Sánchez, É., Zapata, Y., Beltrán, C., Cotes, A., Antía, G., Orrego, C., Salgado, N., Rodríguez, Lady, ... Tamayo, P. (2020). Tecnología para el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth). In *Tecnología para el cultivo de la mora (Rubus glaucus Benth)*. (Issue March). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7403251>
- Gallego, J., Cardona, N. L., & Restrepo, F. (2014). Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Purpureocillium* sp. cepa UdeA0106 con biocontroladores y productos fitosanitarios utilizados en cultivos de crisantemo. *Actualidades Biológicas*, 36(101), 173–187. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842014000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Gandarilla, F. (2012). Evaluacion de Aislados Nativos de Hongos Entomopatogenos de Zonas Citricolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). 1–155. <http://eprints.uanl.mx/2802/1/1080237547.pdf>
- Glare, T., Jurat, J., & O'Callaghan, M. (2017). Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice*, 47–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00004-4>
- Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 226, 293–301. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2017.09.002>
- Ishak, A., Zulkepli, F., Hayin, N., Md Zain, N., & Sapak, Z. (2021). Effect of high inlet temperature of spray dryer on viability of microencapsulated *Trichoderma*

- asperellum* conidia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 757(1), 012023. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/757/1/012023>
- Jin, X., & Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56(2), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.11.008>
- Junqueira, M., Alarcón, E., & Niranjana, K. (2016). The efficacy of potassium sorbate-coated packaging to control postharvest gray mold in raspberries, blackberries and blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 205–208. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2015.09.014>
- Katovich, C. (2012). *Phyllophaga* spp. Harris 1827 (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) y *Cyclocephala* spp. Dejean 1821 (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae) gallinas ciegas. In *Sader-Senasica* (Vol. 1827). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600893/Gallinas_ciegas.pdf
- Lewis, M., Koivunen, E., Swett, C., & Hamby, K. (2019). Associations Between *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and fungi in raspberries. *Environmental Entomology*, 48(1), 68–79. <https://doi.org/10.1093/EE/NVY167>
- Montero, V., Guerrero, Z., José, A., Martínez, T., Guevara, L., & González, M. (2013). Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4, 1043–1054.
- Mora, E., Castilho, C., & Fraga, E. (2018). Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 84(0). <https://doi.org/10.1590/1808-1657000552015>
- Morocho, N., Morales, M., & Ruiz, J. (2020). Presencia de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) y hongos entomopatógenos potenciales para su control biológico en sistemas agrícolas de Saraguro (Loja, Ecuador). *Cedamaz*, 10(2), 51–56. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/896>
- Mosquera, V., Alwang, J., Andrago, G., Domínguez, J., Escudero, L., Martínez, A., & Tech, V. (2016). Tipificación de los productores de mora de Ecuador para optimizar sus estrategias de medios de vida Ecuadorian blackberry producers' typification to optimize their livelihood strategies INIAP - Estación Experimental Santa Catalina INIAP - Estación Experi. *Instituto Nacional de Investigaciones*

Agropecuarias de *Ecuador*, 23.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4660/1/iniapscCD199.pdf>

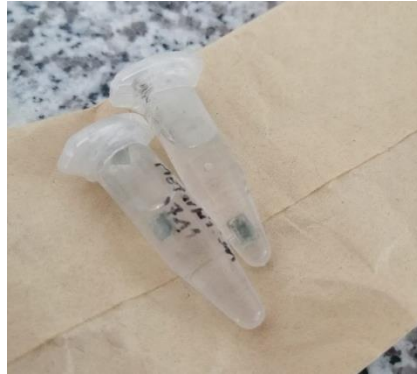
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77–90. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Oliveira, C., & Frizzas, M. (2021). Root consumption and damage estimates caused by *Phyllophaga capillata* and *Aegopsis bolboceridus* (Coleoptera, Melolonthidae) larvae in soybean and maize in central Brazil. *Crop Protection*, 146, 105651. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2021.105651>
- Ortiz, N., Ochoa, L., González, S., Rutiaga, O., & Gallegos, J. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *TecnoLógicas*, 24(52), e1962. <https://doi.org/10.22430/22565337.1962>
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494–506. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.205>
- Pacheco, M., Reséndiz, J., & Arriola, V. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México : una revisión Entomopathogenic organisms for pest control in the mexican agriculture , livestock and forest sectors : a review Introducción El uso indiscriminado. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), 1–32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Padilla, G., Bernal, M., Vélez, P., & Montoya, C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafe*, 51(1), 28–40.
- Pandey, A., & Yarzabal, L. A. (2018). Bioprospecting cold-adapted plant growth promoting microorganisms from mountain environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 103:2, 103(2), 643–657. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9515-2>
- Pérez, R., Loján, P., Pérez, C., & Carrera, J. (2023). Evaluation of *Rhizobium* strains collected in Tungurahua and Cotopaxi on the growth of *Lupinus mutabilis*, under semi-controlled conditions. *Journal of Agricultural Sciences Research* (2764-

- 0973), 3(6), 2–15. <https://doi.org/10.22533/at.ed.973362327042>
- Ramos, I. (2015). *Efectividad biológica en campo de un microencapsulado de Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin sobre Metamasius spinolae (Gyllenhal)*.
- Rodrigues, M., Filho, A., Giordano, I., Denadae, B., Fernandes, J., & Forim, M. (2017). Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39(4), 457–464. <https://doi.org/10.4025/ACTASCIAGRON.V39I4.32903>
- Shah, S., Ash, G., & Wilson, B. (2022). Resporulation of calcium alginate encapsulated *Metarhizium anisopliae* on metham®-fumigated soil and unfectivity on larvae of tenebrio molitor. *Journal of Fungi 2022, Vol. 8, Page 1114*, 8(10), 1114. <https://doi.org/10.3390/JOF8101114>
- Sapkota, P. (2006). White Grubs. *Encyclopedia of Entomology*, 2555–2555. https://doi.org/10.1007/0-306-48380-7_4586
- Sarma, B., Puzari, K., Dutta, P., & Pandey, A. (2023). An alginate-based encapsulation enhances shelf life and bioactivity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00714-y>
- Shin, T., Lee, M., Park, S., Lee, S., Kim, W., & Kim, J. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(4). <https://doi.org/10.1002/ARCH.21747>
- Smaghe, F., Spooner, R., Chen, H., & Donovan, M. (2023). Biological control of arthropod pests in protected cropping by employing entomopathogens: Efficiency, production and safety. *Biological Control*, 186, 105337. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2023.105337>
- Takeiti, C., Kieckbusch, T., & Collares, F. (2010). Morphological and Physicochemical Characterization of Commercial Maltodextrins with Different Degrees of Dextrose-Equivalent. *International Journal of Food Properties*, 13(2), 411–425. <https://doi.org/10.1080/10942910802181024>
- Valle, S., Torres, R., Caicedo, W., Abril, R., & Sucoshañay, D. (2021). Isolation and characterization of *Metarhizium spp.* of sugar cane crops and their pathogenicity against *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia Tecnologia Agropecuaria*, 23(1). https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2361

- Viera, W., Noboa, M., Martínez, A., Báez, F., Jácome, R., Medina, L., & Jackson, T. (2019). *Trichoderma asperellum* increases crop yield and fruit weight of blackberry (*Rubus glaucus*) under subtropical Andean conditions. *Vegetos*, 32(2), 209–215. <https://doi.org/10.1007/S42535-019-00024-5/METRICS>
- Villalba, R., Parra, M., & Gutierrez, E. (2009). Producción limpia de la mora en el departamento del Huila. In *Secretaría técnica cadena productiva de frutas* (p. 21). <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mora/Normatividad/9>. Manual tecnico cultivo de la mora en el Huila.pdf
- Villamizar, L., Bustillo, A., Zuluaga, M., Cotes, A., Espinel, C., & Torres, L. (2018). *Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga*. 334,334-367,367. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34071>
- Villares, M., Martínez, A., Viterí, P., Viera, W., Jácome, R., Ayala, G., & Noboa, M. (2016). El cultivo de mora en el Ecuador. *INIAP -Estación Experimental Santa Catalina*. <http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Zhao, J., Chen, Y., Keyhani, N. O., Wang, C., Li, Y., Pu, H., Li, J., Liu, S., Lai, P., Zhu, M., He, X., Cai, S., Guan, X., & Qiu, J. (2023). Isolation of a highly virulent *Metarhizium* strain targeting the tea pest, *Ectropis obliqua*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1164511. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1164511/BIBTEX>

Anexos

Anexo 1. Cepa donada de *M. anisopliae*



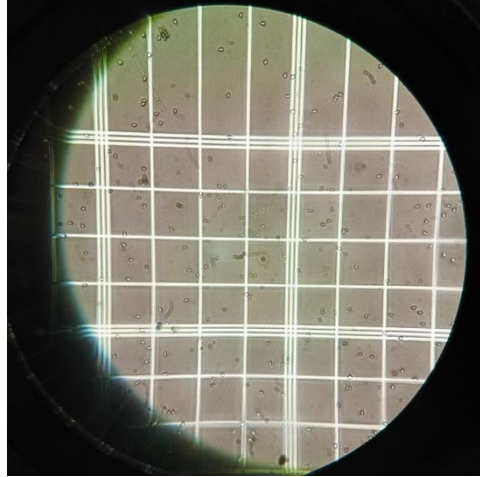
Anexo 2. Trampas de materia orgánica y melaza para la captura de *Phyllophaga spp.*



Anexo 3. Larvas recolectadas de *Phyllophaga spp.*



Anexo 4. Conteo de conidios en los cuadrantes de la cámara de Neubauer



$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{recuento obtenido}}{\text{número de cuadros}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{44,68 \times 10^2 \times 10^3}{(0.25 \times 0.25) \times 0.1} = 7.1 \times 10^9$$

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

$$C2 = \frac{7.1 \times 10^9 * 5 \text{ml}}{250 \text{ml}}$$

$$C2 = 1.42 \times 10^9$$

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{recuento obtenido}}{\text{número de cuadros}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{44,20 \times 10^2 \times 10^3}{(0.25 \times 0.25) \times 0.1} = 7.08 \times 10^8$$

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

$$C2 = \frac{7.08 \times 10^8 * 5 \text{ml}}{250 \text{ml}}$$

$$C2 = 1.4 \times 10^7$$

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{recuento obtenido}}{\text{número de cuadros}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{42.5 \times 10^2 \times 10^3}{(0.25 \times 0.25) \times 0.1} = 7.08 \times 10^8$$

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

$$C2 = \frac{C1 * V1}{V2}$$

$$C2 = \frac{6.8 \times 10^6 * 5 \text{ml}}{250 \text{ml}}$$

$$C2 = 1.3 \times 10^5$$

Anexo 5. Encapsulaciones mediante gelificación iónica (A) y secado por aspersión (B)



Anexo 6. Rendimiento de las microcápsulas después del secado por aspersión

Principio activo 1 g

Contenido de los materiales encapsulantes: 49 g

Maltodextrina: 34.3 g

Goma arábiga: 14.7 g

Agua: 167 g

Rendimiento

Concentración 1x10⁹

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{\text{peso final}}{\text{menos pso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{58.74}{217} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = 27.06$$

Rendimiento**Concentración 1x10⁷**

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{\text{peso final}}{\text{menos peso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{54.62}{217} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = 25.17\%$$

Rendimiento**Concentración 1x10⁵**

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{\text{peso final}}{\text{menos peso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = \frac{56.45}{217} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento del microencapsulado} = 26.01\%$$

Tabla 1. Promedio del rendimiento en secado por aspersión

| Concentración conidios/ ml | Rendimiento | Promedio |
|---------------------------------------|--------------------|-----------------|
| 1,3x10 ⁵ | 26.01% | |
| 1,4x10 ⁷ | 25.17 % | |
| 1,4x10 ⁹ | 27.06% | 26.08 % |

Concentración 1x10⁵**Peso inicial:** 50 g**Peso final:** 42.78 g

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{42.78}{50} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = 85.56\%$$

Anexo 7. Rendimiento de las capsulas de alginato de sodio y cloruro de calcio.

Concentración 1x10⁵

Peso inicial: 50 g

Peso final: 42.78 g

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{42.78}{50} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = 85.56\%$$

Concentración 1x10⁷

Peso inicial: 50 g

Peso final: 42.88 g

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{42.88}{50} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = 85.76\%$$

Concentración 1x10⁹

Peso inicial: 50 g

Peso final: 43.41 g

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$$

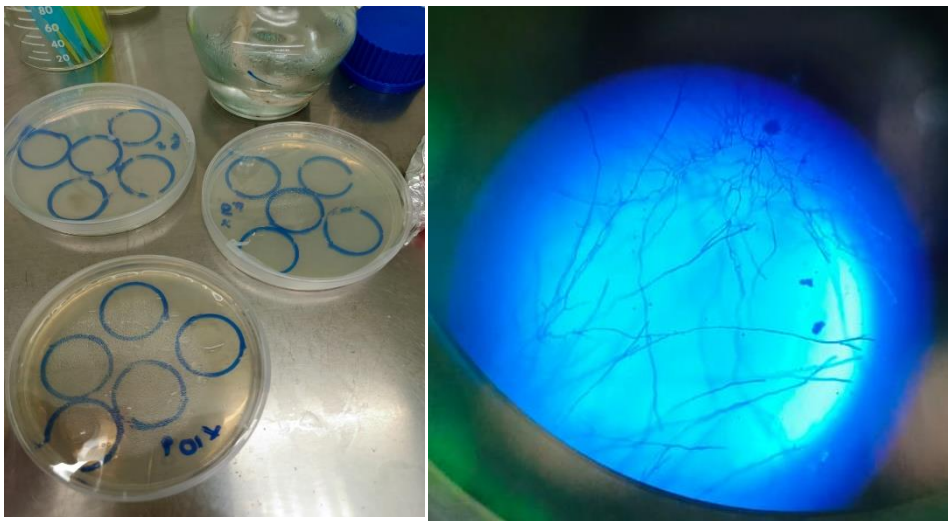
$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = \frac{43.41}{50} * 100$$

$$\% \text{ rendimiento de capsulas} = 86.82\%$$

Tabla 2. Promedio del rendimiento de gelificación iónica

| Concentración conidios/ ml | Rendimiento | Promedio |
|---------------------------------------|--------------------|-----------------|
| 1x10 ⁵ | 85.56 % | |
| 1x10 ⁷ | 85.76 % | |
| 1x10 ⁹ | 86.82 % | 86.04 % |

Anexo 8. Evaluación de viabilidad



Secado por aspersión

1x10⁵

% de germinación

Conidios germinados

Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{113}{195} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 57,94 \%$$

1x10⁷

% de germinación

Conidios germinados

Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{91}{186} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 48,92 \%$$

1×10^7

% de germinación

Conidios germinados

Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{73}{197} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 37,05 \%$$

Gelificación iónica

1×10^5

% de germinación

Conidios germinados

Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{281}{297} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 94.61\%$$

1×10^7

% de germinación

Conidios germinados

Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{289}{307} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 94.13\%$$

1×10^9

% de germinación

Conidios germinados

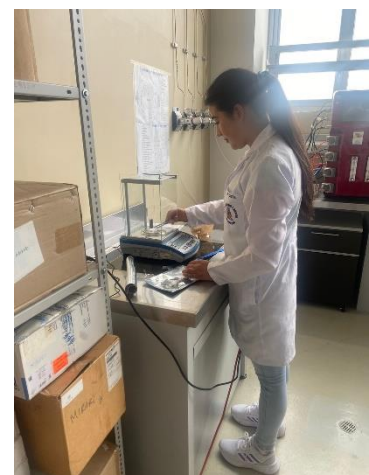
Conidios no germinados

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{\text{conidios germinados}}{\text{conidios no germinados}} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{283}{302} * 100$$

$$\% \text{ de germinacion} = 94.14 \%$$

Anexo 9. Desinfección de las larvas y pesaje de los encapsulados para las pruebas *in vitro*.



Anexo 10.

Cámaras húmedas para las pruebas in vitro de cada uno de los tratamientos



Anexo 11. Infección larvaria por parte *M. anisopliae*



Anexo 12. Tablas de Análisis

Tabla 3. Tabla de días a la infección

| Días a la Infección | | | | | | | | | |
|---------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| Tratamientos | Repeticiones | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 | Promedio |
| C1SM | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 | 1,57 |
| C1SM | 2 | 0 | 0 | 3 | 4 | 5 | 6 | 6 | 3,43 |
| C1SM | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2,14 |
| C2SM | 1 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 4,29 |
| C2SM | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 6 | 6 | 2,71 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|------|
| C2SM | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | 1,86 |
| C3SM | 1 | 0 | 0 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 | 4,00 |
| C3SM | 2 | 0 | 0 | 4 | 4 | 5 | 6 | 6 | 3,57 |
| C3SM | 3 | 0 | 1 | 3 | 4 | 6 | 7 | 8 | 4,14 |
| C1SA | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 4 | 1,86 |
| C1SA | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 1,71 |
| C1SA | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1,71 |
| C1GI | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1,71 |
| C1GI | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 | 5 | 2,71 |
| C1GI | 3 | 0 | 0 | 3 | 5 | 6 | 6 | 8 | 4,00 |
| C2SA | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 5 | 6 | 2,43 |
| C2SA | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 6 | 2,29 |
| C2SA | 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 5 | 6 | 2,57 |
| C2GI | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 6 | 6 | 2,71 |
| C2GI | 2 | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 | 6 | 6 | 3,71 |
| C2GI | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 | 3,14 |
| C3SA | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | 6 | 6 | 3,29 |
| C3SA | 2 | 0 | 3 | 4 | 4 | 5 | 6 | 6 | 4,00 |
| C3SA | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 6 | 6 | 3,00 |
| C3GI | 1 | 0 | 0 | 4 | 5 | 6 | 6 | 8 | 4,14 |
| C3GI | 2 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 7 | 3,43 |
| C3GI | 3 | 0 | 0 | 3 | 5 | 5 | 7 | 8 | 4,00 |

Tabla 4. Porcentaje de severidad de la infección

| Porcentaje en base a la escala de severidad de la infección | | | | | | | | | | |
|--|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-------|
| Tratamientos | Repeticiones | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 | Dia 4 | Dia 5 | Dia 6 | Dia 7 | Promedio | % |
| C1SM | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,43 | 8,57 |
| C1SM | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1,86 | 37,14 |
| C1SM | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2,00 | 40,00 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|------|-------|
| C2SM | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 2,57 | 51,43 |
| C2SM | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 | 5 | 2,71 | 54,29 |
| C2SM | 3 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | 2,86 | 49,52 |
| C3SM | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 2,57 | 51,43 |
| C3SM | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 4 | 5 | 2,29 | 45,71 |
| C3SM | 3 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 2,86 | 57,14 |
| C1SA | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1,29 | 25,71 |
| C1SA | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1,43 | 28,57 |
| C1SA | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 4 | 1,86 | 37,14 |
| C1GI | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1,86 | 37,14 |
| C1GI | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 2,43 | 48,57 |
| C1GI | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 2,43 | 48,57 |
| C2SA | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | 5 | 2,29 | 45,71 |
| C2SA | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 4 | 4 | 1,57 | 31,43 |
| C2SA | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 2,29 | 45,71 |
| C2GI | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 4 | 1,57 | 31,43 |
| C2GI | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 2,43 | 48,57 |
| C2GI | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 5 | 5 | 2,86 | 57,14 |
| C3SA | 1 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 2,29 | 45,71 |
| C3SA | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 2,43 | 48,57 |
| C3SA | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 4 | 5 | 2,29 | 45,71 |
| C3GI | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 4 | 5 | 5 | 2,57 | 51,43 |
| C3GI | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 5 | 5 | 2,43 | 48,57 |
| C3GI | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 5 | 5 | 2,86 | 57,14 |

Análisis sobre días a la infección

Análisis prueba de normalidad

H0: Normal

H1: No normal

Alfa: 0.05

| | | |
|-------------------------|------|--------|
| Valor p de Shapiro-Wilk | C1SM | 0.580 |
| | C2SM | 0.672 |
| | C3SM | 0.454 |
| | C1SA | < .001 |
| | C1GI | 0.861 |
| | C2SA | 1.000 |
| | C2GI | 0.846 |
| | C3SA | 0.546 |
| | C3GI | 0.358 |

| |
|---------------|
| P Alfa |
| 0.057 > 0.050 |

Tabla 5. Análisis prueba de normalidad

| Grupo | P Alfa | Decisión | Conclusión |
|-------|---------------|------------------|------------|
| C1SM | 0.580 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C2SM | 0.672 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C3SM | 0.454 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C1SA | 1.000 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C1GI | 0.861 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C2SA | 0.001 < 0.050 | Se rechaza H0 | No Normal |
| C2GI | 0.846 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C3SA | 0.546 > 0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C3GI | 0.358 < 0.050 | Se rechaza H0 | No Normal |

Prueba de igualdad de varianzas (LEVENE)

Con respecto al análisis de la prueba de igualdad de varianzas se obtiene:

H0: Varianzas iguales

H1: Varianzas no iguales

Alfa: 0.050

Comprobaciones de Supuestos

| Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas | | | |
|---|-----|-----|-------|
| F | gl1 | gl2 | p |
| 2.42 | 8 | 18 | 0.057 |

No se rechaza Ho, por lo tanto, al 95% de confianza, las varianzas son iguales.

Análisis ANOVA

A partir de los valores obtenidos se concluye que el método es viable mediante ANOVA debido que la mayoría de tratamiento son Normales y las varianzas son iguales.

H0: Los k grupos son iguales

H1: Los k grupos no son iguales

Alfa: 0.050

k: 9

ANOVA

ANOVA - Promedio Días a la Infección

| | Suma de Cuadrados | gl | Media Cuadrática | F | p | η^2 |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|-------|----------|
| Tratamientos | 12.14 | 8 | 1.517 | 3.02 | 0.024 | 0.573 |
| Residuos | 9.04 | 18 | 0.502 | | | |

Tabla 6. Análisis prueba de ANOVA

| |
|---------------|
| P Alfa |
| 0.024 <0.050 |

Se rechaza la H0, por lo tanto, al 95% de confianza, los 9 grupos no son iguales, es decir, los días a la infección no son iguales.

Análisis prueba Tukey

H0: Los grupos son iguales

H1: Los grupos no son iguales

Tabla 7. Comparaciones Post Hoc-Tratamientos

Comparaciones Post Hoc - Tratamientos

| Comparación | | Diferencia de Medias | EE | gl | t | P _{tukey} | La d de Cohen |
|--------------|--------------|----------------------|------|------|-------|--------------------|---------------|
| Tratamientos | Tratamientos | | | | | | |
| C1SM | - C2SM | -2.860 | 7.12 | 18.0 | 0.402 | 1.000 | -0.328 |
| | - C3SM | 22.880 | 7.12 | 18.0 | 3.214 | 0.087 | 2.624 |
| | - C1SA | 4.763 | 7.12 | 18.0 | 0.669 | 0.999 | 0.546 |
| | - C1GI | -0.953 | 7.12 | 18.0 | 0.134 | 1.000 | -0.109 |
| | - C2SA | 10.477 | 7.12 | 18.0 | 1.472 | 0.854 | 1.201 |
| | - C2GI | 5.713 | 7.12 | 18.0 | 0.802 | 0.995 | 0.655 |
| | - C3SA | 20.953 | 7.12 | 18.0 | 2.943 | 0.142 | 2.403 |
| | - C3GI | 6.667 | 7.12 | 18.0 | 0.936 | 0.987 | 0.765 |
| C2SM | - C3SM | 25.740 | 7.12 | 18.0 | 3.615 | 0.040 | 2.952 |
| | - C1SA | 7.623 | 7.12 | 18.0 | 1.071 | 0.972 | 0.874 |
| | - C1GI | 1.907 | 7.12 | 18.0 | 0.268 | 1.000 | 0.219 |
| | - C2SA | 13.337 | 7.12 | 18.0 | 1.873 | 0.638 | 1.529 |
| | - C2GI | 8.573 | 7.12 | 18.0 | 1.204 | 0.945 | 0.983 |
| | - C3SA | 23.813 | 7.12 | 18.0 | 3.345 | 0.068 | 2.731 |
| | - C3GI | 9.527 | 7.12 | 18.0 | 1.338 | 0.906 | 1.093 |
| C3SM | - C1SA | -18.117 | 7.12 | 18.0 | 2.545 | 0.275 | -2.078 |
| | - C1GI | -23.833 | 7.12 | 18.0 | 3.348 | 0.068 | -2.733 |
| | - C2SA | -12.403 | 7.12 | 18.0 | 1.742 | 0.716 | -1.422 |
| | - C2GI | -17.167 | 7.12 | 18.0 | 2.411 | 0.335 | -1.969 |
| | - C3SA | -1.927 | 7.12 | 18.0 | 0.271 | 1.000 | -0.221 |
| | - C3GI | -16.213 | 7.12 | 18.0 | 2.277 | 0.403 | -1.859 |
| C1SA | - C1GI | -5.717 | 7.12 | 18.0 | 0.803 | 0.995 | -0.656 |
| | - C2SA | 5.713 | 7.12 | 18.0 | 0.802 | 0.995 | 0.655 |
| | - C2GI | 0.950 | 7.12 | 18.0 | 0.133 | 1.000 | 0.109 |
| | - C3SA | 16.190 | 7.12 | 18.0 | 2.274 | 0.404 | 1.857 |
| | - C3GI | 1.903 | 7.12 | 18.0 | 0.267 | 1.000 | 0.218 |
| C1GI | - C2SA | 11.430 | 7.12 | 18.0 | 1.605 | 0.790 | 1.311 |
| | - C2GI | 6.667 | 7.12 | 18.0 | 0.936 | 0.987 | 0.765 |
| | - C3SA | 21.907 | 7.12 | 18.0 | 3.077 | 0.112 | 2.512 |
| | - C3GI | 7.620 | 7.12 | 18.0 | 1.070 | 0.972 | 0.874 |

Comparaciones Post Hoc - Tratamientos

| Comparación | | Diferencia de Medias | EE | gl | t | p _{Tukey} | La d de Cohen |
|--------------|--------------|----------------------|------|------|-------|--------------------|---------------|
| Tratamientos | Tratamientos | | | | | | |
| C2SA | - C2GI | -4.763 | 7.12 | 18.0 | 0.669 | 0.999 | -0.546 |
| | - C3SA | 10.477 | 7.12 | 18.0 | 1.472 | 0.854 | 1.201 |
| | - C3GI | -3.810 | 7.12 | 18.0 | 0.535 | 1.000 | -0.437 |
| C2GI | - C3SA | 15.240 | 7.12 | 18.0 | 2.141 | 0.479 | 1.748 |
| | - C3GI | 0.953 | 7.12 | 18.0 | 0.134 | 1.000 | 0.109 |
| C3SA | - C3GI | -14.287 | 7.12 | 18.0 | 2.007 | 0.558 | -1.638 |

Nota. Las comparaciones se basan en medias marginales estimadas

Tabla 8. Análisis prueba Tukey

| Grupo | P Alfa | Decisión | Conclusión |
|-------------|-------------|------------------|----------------|
| C1SM - C2SM | 0.771>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C3SM | 0.239>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C1SA | 0.995>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C3GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C2SA | 0.274>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C2GI | 0.937>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM - C1SA | 0.034<0.050 | No se rechaza H0 | Iguales |
| C1SM - C1GI | 0.625>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C3SM | 0.982>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C3SA | 0.994>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C3GI | 0.813>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C2SA | 0.990>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C2GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C1SA | 0.524>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM - C1GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C3SA | 0.673>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C3GI | 0.272>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C2SA | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C2GI | 0.886>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C1SA | 0.971>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM - C1GI | 0.997>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SA - C3GI | 0.997>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SA - C2SA | 0.723>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SA - C2GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SA - C3SA | 0.157>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |

| | | | |
|-------------|-------------|------------------|----------------|
| C3SA – C3GI | 0.971>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C2SA | 0.309>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C2GI | 0.956>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C2SA | 0.040<0.050 | No se rechaza H0 | Iguales |
| C3GI – C3GI | 0.673>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C2GI | 0.916>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C1SA | 0.956>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C3GI | 0.999>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2GI – C3SA | 0.309>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2GI – C3GI | 0.999>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C1GI | 0.677>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |

Análisis medios marginales estimadas

Medias Marginales Estimadas - Tratamientos

| Tratamientos | Media | EE | Intervalo de Confianza al 95% | |
|--------------|-------|-------|-------------------------------|----------|
| | | | Inferior | Superior |
| C1SM | 3.90 | 0.409 | 3.044 | 4.76 |
| C2SM | 2.95 | 0.409 | 2.094 | 3.81 |
| C3SM | 2.38 | 0.409 | 1.520 | 3.24 |
| C1SA | 3.43 | 0.409 | 2.570 | 4.29 |
| C1GI | 3.86 | 0.409 | 2.997 | 4.72 |
| C2SA | 2.43 | 0.409 | 1.570 | 3.29 |
| C2GI | 3.19 | 0.409 | 2.327 | 4.05 |
| C3SA | 1.76 | 0.409 | 0.900 | 2.62 |
| C3GI | 2.81 | 0.409 | 1.947 | 3.67 |

Análisis del porcentaje en base a la escala de severidad de la infección

Análisis prueba de normalidad

H0: Normal

H1: No normal

Alfa: 0.050

| | | |
|-------------------------|------|--------|
| Valor p de Shapiro-Wilk | C1SM | 0.999 |
| | C2SM | 0.998 |
| | C3SM | 0.157 |
| | C1SA | < .001 |
| | C1GI | 0.638 |
| | C2SA | < .001 |
| | C2GI | 0.637 |
| | C3SA | 0.464 |
| | C3GI | < .001 |

Tabla 9. Análisis prueba de normalidad

| Grupo | P Alfa | Decisión | Conclusión |
|-------|-------------|------------------|------------|
| C1SM | 0.999>0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C2SM | 0.998>0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C3SM | 0.157<0.050 | Se rechaza H0 | No normal |
| C1SA | 0.001<0.050 | Se rechaza H0 | No normal |
| C1GI | 0.638>0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C2SA | 0.001<0.050 | Se rechaza H0 | No normal |
| C2GI | 0.637>0.050 | No se rechaza H0 | Normal |
| C3SA | 0.464<0.050 | Se rechaza H0 | No normal |
| C3GI | 0.001<0.050 | Se rechaza H0 | No normal |

Prueba de igualdad de varianzas (LEVENE)

Con respecto al análisis de la prueba de igualdad de varianzas se obtiene:

H0: Varianzas iguales

H1: Varianzas no iguales

Alfa: 0.050

Comprobaciones de Supuestos

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas

| F | gl1 | gl2 | p |
|------|-----|-----|-------|
| 3.76 | 8 | 18 | 0.009 |

| P Alfa |
|---------------|
| 0.009 < 0.050 |

Se rechaza H0, por lo tanto, al 95% de confianza, las varianzas no son iguales.

Análisis ANOVA

A partir de los valores obtenidos se concluye que el método es viable mediante ANOVA debido que la mayoría de tratamiento son Normales y las varianzas son iguales.

H0: Los k grupos son iguales

H1: Los k grupos no son iguales

Alfa: 0.025

k: 9

ANOVA

ANOVA - Porcentaje de Severidad de la Infección

| | Suma de Cuadrados | gl | Media Cuadrática | F | p | η^2 |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|-------|----------|
| Tratamientos | 2018 | 8 | 252.3 | 3.32 | 0.016 | 0.596 |
| Residuos | 1369 | 18 | 76.0 | | | |

Tabla 10. Análisis prueba ANOVA

| P Alfa |
|---------------|
| 0.016 < 0.050 |

Se rechaza la H0, por lo tanto, al 95% de confianza, los 9 grupos no son iguales, es decir, los porcentajes en base a la escala de severidad de la infección cambian en función de los diferentes tratamientos.

Análisis prueba Tukey

H0: Los grupos son iguales

H1: Los grupos no son iguales

Tabla 11. Comparación de tratamientos

Comparaciones Post Hoc - Tratamientos

| Comparación | | Diferencia de Medias | EE | gl | t | ptukey | La d de Cohen |
|--------------|--------------|----------------------|-------|------|-------|--------|---------------|
| Tratamientos | Tratamientos | | | | | | |
| C1SM | - C2SM | -25.717 | 7.11 | 18.0 | 3.616 | 0.040 | -2.952 |
| | - C3SM | -22.857 | 7.11 | 18.0 | 3.214 | 0.087 | -2.624 |
| | - C1SA | -1.903 | 7.11 | 18.0 | 0.268 | 1.000 | -0.219 |
| | - C1GI | -16.190 | 7.11 | 18.0 | 2.276 | 0.403 | -1.859 |
| | - C2SA | -12.380 | 7.11 | 18.0 | 1.741 | 0.716 | -1.421 |
| | - C2GI | -17.143 | 7.11 | 18.0 | 2.410 | 0.335 | -1.968 |
| | - C3SA | -18.093 | 7.11 | 18.0 | 2.544 | 0.275 | -2.077 |
| | - C3GI | -23.810 | 7.11 | 18.0 | 3.348 | 0.068 | -2.733 |
| | C2SM | - C3SM | 2.860 | 7.11 | 18.0 | 0.402 | 1.000 |
| - C1SA | | 23.813 | 7.11 | 18.0 | 3.348 | 0.068 | 2.734 |
| - C1GI | | 9.527 | 7.11 | 18.0 | 1.339 | 0.906 | 1.094 |
| - C2SA | | 13.337 | 7.11 | 18.0 | 1.875 | 0.637 | 1.531 |
| - C2GI | | 8.573 | 7.11 | 18.0 | 1.205 | 0.945 | 0.984 |
| - C3SA | | 7.623 | 7.11 | 18.0 | 1.072 | 0.971 | 0.875 |
| - C3GI | | 1.907 | 7.11 | 18.0 | 0.268 | 1.000 | 0.219 |
| C3SM | - C1SA | 20.953 | 7.11 | 18.0 | 2.946 | 0.142 | 2.405 |
| | - C1GI | 6.667 | 7.11 | 18.0 | 0.937 | 0.987 | 0.765 |

Comparaciones Post Hoc - Tratamientos

| Comparación | | Diferencia de Medias | EE | gl | t | p _{tukey} | La d de Cohen |
|--------------|--------------|----------------------|------|------|-------|--------------------|---------------|
| Tratamientos | Tratamientos | | | | | | |
| | - C2SA | 10.477 | 7.11 | 18.0 | 1.473 | 0.854 | 1.203 |
| | - C2GI | 5.713 | 7.11 | 18.0 | 0.803 | 0.995 | 0.656 |
| | - C3SA | 4.763 | 7.11 | 18.0 | 0.670 | 0.999 | 0.547 |
| | - C3GI | -0.953 | 7.11 | 18.0 | 0.134 | 1.000 | -0.109 |
| C1SA | - C1GI | -14.287 | 7.11 | 18.0 | 2.009 | 0.556 | -1.640 |
| | - C2SA | -10.477 | 7.11 | 18.0 | 1.473 | 0.854 | -1.203 |
| | - C2GI | -15.240 | 7.11 | 18.0 | 2.143 | 0.477 | -1.750 |
| | - C3SA | -16.190 | 7.11 | 18.0 | 2.276 | 0.403 | -1.859 |
| | - C3GI | -21.907 | 7.11 | 18.0 | 3.080 | 0.111 | -2.515 |
| C1GI | - C2SA | 3.810 | 7.11 | 18.0 | 0.536 | 1.000 | 0.437 |
| | - C2GI | -0.953 | 7.11 | 18.0 | 0.134 | 1.000 | -0.109 |
| | - C3SA | -1.903 | 7.11 | 18.0 | 0.268 | 1.000 | -0.219 |
| | - C3GI | -7.620 | 7.11 | 18.0 | 1.071 | 0.971 | -0.875 |
| C2SA | - C2GI | -4.763 | 7.11 | 18.0 | 0.670 | 0.999 | -0.547 |
| | - C3SA | -5.713 | 7.11 | 18.0 | 0.803 | 0.995 | -0.656 |
| | - C3GI | -11.430 | 7.11 | 18.0 | 1.607 | 0.790 | -1.312 |
| C2GI | - C3SA | -0.950 | 7.11 | 18.0 | 0.134 | 1.000 | -0.109 |
| | - C3GI | -6.667 | 7.11 | 18.0 | 0.937 | 0.987 | -0.765 |
| C3SA | - C3GI | -5.717 | 7.11 | 18.0 | 0.804 | 0.995 | -0.656 |

Nota. Las comparaciones se basan en medias marginales estimadas

Tabla 12. Análisis en base a la prueba Tukey

| Grupo | P Alfa | Decisión | Conclusión |
|--------------|---------------|------------------|-------------------|
| C1SM - C2SM | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C3SM | 0.087>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C1SA | 0.999>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C3GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C2SA | 0.854>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C2GI | 0.995>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C1SA | 0.142>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SM – C1GI | 0.987>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C3SM | 0.040<0.050 | No se rechaza H0 | Iguales |
| C2SM – C3SA | 0.972>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C3GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C2SA | 0.638>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C2GI | 0.945>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C1SA | 0.068>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SM – C1GI | 0.906>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C3SA | 0.275>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C3GI | 0.068>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C2SA | 0.716>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C2GI | 0.335>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C1SA | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3SM – C1GI | 0.403>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C3GI | 0.995>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C2SA | 0.995>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C3GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C3SA | 0.404>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C1GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C2SA | 0.790>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C2GI | 0.987>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C1SA | 0.112>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C3GI – C1GI | 0.972>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C2GI | 0.999>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C1SA | 0.854>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2SA – C1GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2GI – C1SA | 0.479>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C2GI -C1GI | 1.000>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |
| C1SA – C1GI | 0.558>0.050 | Se rechaza H0 | No son iguales |

Análisis medios marginales estimales

Tabla 13. Medias marginales estimadas en función de los tratamientos

Medias Marginales Estimadas - Tratamientos

| Tratamientos | Media | EE | Intervalo de Confianza al 95% | |
|--------------|-------|------|-------------------------------|----------|
| | | | Inferior | Superior |
| C1SM | 51.4 | 5.03 | 40.8 | 62.0 |
| C2SM | 54.3 | 5.03 | 43.7 | 64.9 |
| C3SM | 28.5 | 5.03 | 18.0 | 39.1 |
| C1SA | 46.7 | 5.03 | 36.1 | 57.2 |
| C1GI | 52.4 | 5.03 | 41.8 | 63.0 |
| C2SA | 40.9 | 5.03 | 30.4 | 51.5 |
| C2GI | 45.7 | 5.03 | 35.1 | 56.3 |
| C3SA | 30.5 | 5.03 | 19.9 | 41.1 |
| C3GI | 44.8 | 5.03 | 34.2 | 55.3 |

Anexo 13. Estimación de tiempo de muerte larvaria

$$Y = (100 - S) * e^{-k(t-t_0)} + S, \text{ para } t > t_0$$

Donde

Y = porcentaje de sobrevivencia (%) al tiempo t

k = es la tasa de muerte (d^{-1})

t₀ = es el tiempo para el primer muerto (d)

S = es la sobrevivencia asintótica (%)

$$Y = (100 - 17) * e^{-38(t-4)} + 17, \text{ para } t > t_0$$

Y = 17 días.

Anexo 14. Permiso otorgado por el Ministerio del ambiente, agua y transición ecológica.

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA No. 171

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAATE-ARSFC-2023-0171

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

| FECHA INICIO | FECHA FIN |
|--------------|------------|
| 2023-12-04 | 2024-06-04 |

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

| |
|--------|
| Animal |
|--------|

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

| Nº de C./Pasaporte | Nombres y Apellidos | Nacionalidad | Nº REGISTRO SENESCYT | EXPERIENCIA | GRUPO BIOLÓGICO |
|--------------------|--------------------------------|--------------|----------------------|--------------------------|-----------------|
| 1850019033 | CARRERA NUÑEZ WENDY TATIANA | Ecuatoriana | Ninguna | Ninguna | Insecta |
| 1802726628 | PEREZ SALINAS RUTH NARCISA | Ecuatoriana | 101002140345 | Docente universitaria | Insecta |

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Evaluación de la capacidad antagónica de *Metarhizium anisopliae* microencapsulada frente a *Phyllphaga* spp.

7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

| |
|--|
| Evaluar la capacidad antagónica de <i>Metarhizium anisopliae</i> microencapsulada frente a <i>Phyllophaga</i> spp. |
| Comprobar la capacidad antagónica de microcápsulas de <i>Metarhizium anisopliae</i> frente a <i>Phyllophaga</i> spp. en pruebas in vitro |
| Obtener microencapsulas de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> mediante secado por aspersión y gelificación iónica. |
| Capturar a <i>Phyllophaga</i> spp. en estado larvario presentes en cultivo de mora de castilla. |

8.- ÁREA GEOGRÁFICA QUE CUBRE LA RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES O ESPECÍMENES:

| PROVINCIAS | SNAP | BOSQUE PROTECTOR |
|------------|------|------------------|
| TUNGURAHUA | NA | NA |

9.- INFORMACIÓN DE LAS ESPECIES A RECOLECTAR

| CLASE | ORDEN | FAMILIA | GENERO | ESPECIE | TIPO MUESTRA | N° MUESTRA | N° LOTE |
|---------|------------|----------------------------|-------------|---------------------|--------------|------------|---------|
| Insecta | Coleoptera | Scarabaeidae:Melolonthinae | Phyllophaga | Phyllophaga bicolor | Larva | 140 | |

10.- METODOLOGÍA APLICADA EN CAMPO

| | |
|------------------------------|---|
| FASE DE RECOLECCIÓN: | Se realizará un muestreo aleatorio simple en zigzag para tomar las muestras en un terreno en producción de mora de castilla. Se elegirán plantas cuya sintomatología sea marchitez y amarillamiento provocado por la larva de <i>Phyllophaga</i> . Se realizarán trampas con materia orgánica y melaza, las trampas serán puestas en la tierra alrededor de las plantas de manera superficial durante 8 días. |
| FASE DE PRESERVACIÓN: | Se identificarán larvas de segundo estadio, las cuales se mantendrán bajo condiciones apropiadas para su desarrollo, en botes de plástico de 4 litros de capacidad, con 1 kg de suelo estéril, humedad del 40% y temperatura promedio de 26°C. |

11. METODOLOGIA APLICADA EN LABORATORIO

| | |
|---|---|
| MÉTODOS EMPLEADOS EN EL LABORATORIO: | Técnicas de muestreo de suelo, Técnicas de cultivo in vitro |
|---|---|

12.- SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA RECOLECCION.

| Grupo Biológico | Descripción | Tipo de Equipamiento |
|-----------------|-------------|----------------------|
| | | |

| | | |
|-----------------|--|-------------------------|
| a Recolectar | | |
| Insecta | MATERIAL PARA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS | Material en Laboratorio |
| Insecta | : ESTEREOMICROSCOPIOS, MICROSCOPIOS, ESPECTROFOTÓMETRO, COMPUTADORAS, EQUIPO DE DESTILACIÓN DE AGUA, HORNOS, MUFLA, BALANZAS, CONGELADOR, REFRIGERADORAS, IMPRESORAS, SCANNER, TERMOBLOQUE, EQUIPO UTRAD | Material en Campo |

13.- COLECCIONES NACIONALES DEPOSITARIAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO

| | |
|---------|---|
| Insecta | Museo Colecciones Biologicas Universidad Técnica Particular de Loja |
|---------|---|

14.- RESULTADOS ESPERADOS

Lograr la captura de larva de segundo estadio de Phyllophaga, y junto con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* poder realizar un controlador biológico para disminuir el uso de insecticidas químicos para el cultivo de mora en la provincia de Tungurahua

15.- CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO PARA LA TOMA DE DECISIONES A LA ESTRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD 2011-2020.

| METAS | DESCRIPCIÓN |
|--|---|
| Meta04.19.01 Para el 2021, el Ecuador implementa a agenda nacional de investigaciones, con el involucramiento de la academia, sector público, privado, pueblos y nacionalidades. | Permitir el conocimiento de especies nativas del Ecuador e incorporarlas para una producción agrícola limpia y sostenible |

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

1. Solicitud de: **CARRERA NUÑEZ WENDY TATIANA**
2. Institución Nacional Científica : **UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO U.T.A.**
3. Fecha de entrega del informe final o preliminar: **2024/05/20**
4. Valoración técnica del proyecto: **LATORRE HURTADO ERIKA GABRIELA**
5. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS.**
6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS**

Y HONGOS, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

7. Los especímenes o muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO.**

8. Los resultados que se desprendan de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

OBLIGACIONES DEL/ LOS INVESTIGADOR/ES.

9. Ingresar al sistema electrónico de recolecta de especímenes de especies la diversidad biológica del ministerio del ambiente y agua, el o los informes parciales o finales en formato PDF, en el formato establecido.

Con los siguientes anexos:

- Escaneado de el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las Colecciones Científicas Ecuatorianas como Internacionales depositarias de material biológico.
- Escaneado de las publicaciones realizadas o elaboradas en base al material biológico recolectado.
- Escaneado de material fotográfico que considere el investigador pueda ser utilizados para difusión. (se mantendrá los derechos de autor).

10. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos el número de Autorización de Recolección otorgada por el Ministerio del Ambiente y Agua, con el que se recolecto el material biológico.

11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.

12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un año.

13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.

14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **CARRERA NUÑEZ WENDY TATIANA**.

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
VEINTIMILLA YANEZ DAVID ALEJANDRO
2023-11-29



Firmado electrónicamente por:
DAVID ALEJANDRO YANEZ
VEINTIMILLA YANEZ

Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica

Dirección: Calle **1159 y Andalucía**

Código postal: 170525 / Quito-Ecuador

Teléfono: +593-2 398 7600

www.ambiente.gob.ec

