



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**AISLAMIENTO y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS EN DOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA FAMILIAR
REPRESENTATIVOS DE LA COMUNIDAD GAUSHI**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA:

IBETH MISHELLE GANAN QUISPE

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**AISLAMIENTO y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS EN DOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA FAMILIAR
REPRESENTATIVOS DE LA COMUNIDAD GAUSHI**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA: IBETH MISHALLE GANAN QUISPE

DIRECTOR: ING. NORMA SOLEDAD ERAZO SANDOVAL

Riobamba – Ecuador

2023

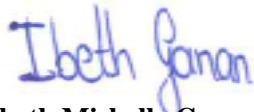
© 2023, **Ibeth Mishelle Ganan Quispe**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Ibeth Mishelle Ganan Quispe, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 1 de junio de 2023



Ibeth Mishelle Ganan Quispe

185007381-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Trabajo de Investigación, **AISLAMIENTO y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS EN DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA FAMILIAR REPRESENTATIVOS DE LA COMUNIDAD GAUSHI**, realizado por la señorita: **IBETH MISHELLE GANAN QUISPE**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

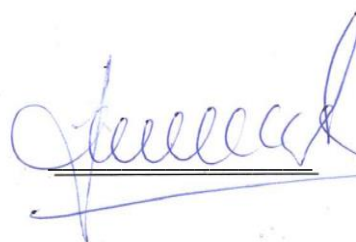
FECHA

Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



2023-06-1

Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval.
DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-06-1

Ing. Marco Aníbal Vivar Arrieta
ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-06-1

DEDICATORIA

A mi madre, Yolanda Q, a mi abuelita Beatriz y a mi tío Byron que jamás dejaron de confiar en mí y me dieron su apoyo incondicional a pesar de todas las adversidades que se presentaron durante mi carrera estudiantil, me brindaron amor y sabios consejos; de la misma forma agradezco a toda mi familia que de una u otra forma siempre me brindaron su apoyo.

A mis hermanos Sebastián y Emanuel que hicieron mis días más felices y relajados.

Ibeth

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme salud y vida para poder culminar mis estudios y cumplir con mi sueño, además de la sabiduría y perseverancia a lo largo del camino. De la misma manera, agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Agronomía por haberme formado como una profesional, de la misma forma agradezco a mi directora de Tesis Ing. Norma Erazo ya que gracias a sus consejos, conocimientos y correcciones hoy en día tengo la dicha de culminar con el presente trabajo, también agradezco al Ing. Marco Vivar por darme su voto de confianza y al trabajar todos juntos logramos el objetivo propuesto. A todos mis profesores por compartir sus conocimientos y formarme como persona y a la vez como una profesional. A mis amigos que hoy se convierten en colegas, con aquellos que compartí muchos momentos únicos dentro y fuera de las aulas, gracias por todo su apoyo.

Ibeth

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.2	Objetivos	2
1.2.1	General	2
1.2.2	Específicos	2
1.3	Justificación	3
1.4	Hipótesis de investigación	3
1.4.1	Hipótesis nula.....	3
1.4.2	Hipótesis alterna.....	3

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1	Microorganismos entomopatógenos	4
2.1.1	Generalidades	4
2.1.2	Clasificación	4
2.1.2.1	Hongos.....	4
2.1.2.2	Bacterias	7
2.1.3	Métodos de aislamiento	10
2.1.3.1	Aislamiento por dilución seriada.....	11
2.1.3.2	Aislamiento directo	11
2.1.3.3	Aislamiento usando <i>Galleria mellonella</i>	11
2.1.4	Caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos	13
2.1.4.1	Macroscópica.....	13
2.1.4.2	Microscópica	14

2.1.4.3	Molecular.....	14
2.1.5	Uso potencial	15
2.2	Agricultura familiar.....	15
2.2.1	Generalidades.....	15
2.2.2	Origen	16
2.2.3	Importancia	16
2.2.4	Beneficios	17
2.2.5	Clasificación	17
2.2.5.1	De subsistencia.....	17
2.2.5.2	De transición.....	17
2.2.5.3	Consolidada.....	17
2.2.6	Agroecología.....	18
2.2.7	Huertos agroecológicos.....	18
2.2.8	Manejo de huertos familiares.....	18
2.2.9	Bioinsumos	19
2.2.10	Uso de los bioinsumos	19

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	21
3.1	Características del lugar	21
3.1.1	Localización.....	21
3.1.2	Ubicación geográfica	21
3.1.3	Características climáticas	22
3.2	Materiales y equipos	22
3.2.1	Materiales de campo	22
3.2.2	Materiales de laboratorio	22
3.2.3	Materiales de oficina.....	23
3.2.4	Equipos de laboratorio	23
3.3	Métodos y técnicas.....	23
3.3.1	Actividades que se desarrollaron en el área de estudio	24
3.3.1.1	Muestreo de suelos	24
3.3.1.2	Crianza de <i>Galleria mellonella</i>	24
3.3.1.3	Análisis físico químico de las muestras de suelo en estudio	24
3.3.2	Actividades que se desarrollaron en el laboratorio de Ciencias Biológicas.....	24
3.3.2.1	Colocación de <i>Galleria mellonella</i> en las muestras de suelo	24

3.3.2.2	Recuperación de cadáveres de <i>Galleria mellonella</i>	25
3.3.2.3	Registro de datos	25
3.3.2.4	Aislamiento de hongos y cultivos puros.....	25
3.3.2.5	Aislamientos de bacterias y cultivos puros	25
3.3.2.6	Selección de aislamientos más efectivos	26
3.3.2.7	Conteo de esporas/ml	26
3.3.2.8	Escala McFarland.....	26
3.3.2.9	Observación de esporas a nivel microscópico.....	27
3.3.2.10	Determinación de la DL 50 y TL 50 con los aislamientos más efectivos	27
3.3.3	Factores en estudio.....	28
3.3.4	Unidad experimental	28
3.3.5	Tratamientos	28
3.3.6	Diseño experimental	28
3.3.7	Análisis estadístico.....	29

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	30
4.1	Procesamiento, análisis e interpretación de resultados	30
4.1.1	Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo	30
4.1.2	Número de microorganismos aislados	30
4.1.3	Número de especies entomopatógenas aisladas.....	31
4.1.4	Aislamientos de mayor efectividad.....	32
4.1.4.1	Número de esporas/mL.....	32
4.1.4.2	Porcentaje de mortalidad	34
4.1.4.3	Dosis Letal 50.....	34
4.1.4.4	Tiempo Letal 50	38
4.1.5	Caracterización morfológica y molecular	39
4.1.5.1	Descripción macroscópica.....	39
4.1.5.2	Descripción microscópica	41
4.1.5.3	Identificación molecular	42
4.2	Discusión de los resultados	43
4.2.1	Análisis fisicoquímicos de las muestras de suelo	43
4.2.2	Número de especies entomopatógenas.....	44
4.2.3	Aislamientos más efectivos.....	44
4.2.4	Porcentaje de mortalidad.....	45

4.2.5	Dosis letal 50.....	45
4.2.6	Tiempo letal 50	45
4.2.7	Caracterización morfológica	46
4.2.8	Caracterización molecular.....	46
4.3	Comprobación de hipótesis.....	46

CAPITULO V

5.	Conclusiones y recomendaciones.....	47
5.1	Conclusiones	47
5.2	Recomendaciones.....	47

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3:	Ubicación geográfica del sitio experimental. Comunidad San José de Gaushi, provincia de Chimborazo-Ecuador, 2022.	21
Tabla 2-3:	Características climáticas del sitio experimental - Gaushi.	22
Tabla 3-3:	Escala McFarland 0,5.	27
Tabla 4-3:	Especificaciones de las unidades experimentales a nivel de laboratorio.	28
Tabla 5-3:	Especificaciones de los tratamientos en estudio.	28
Tabla 6-4:	Propiedades fisicoquímicas del sitio experimental – Gaushi.	30
Tabla 7-4:	Cantidad de hongos y bacterias encontradas en el SO y SC	31
Tabla 8-4:	ANOVA para el número de larvas muertas recuperadas de <i>G. mellonella</i> por la presencia de microorganismos.	31
Tabla 9-4:	Número de especies entomopatógenas encontradas.	32
Tabla 10-4:	Número de esporas/ml encontrados en los aislamientos	32
Tabla 11-4:	Número de bacterias/ml encontrados en los aislamientos	33
Tabla 12-4:	Tiempo letal 50 para los tratamientos más efectivos.	38

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Aislamiento puro de <i>Beauveria bassiana</i>	6
Ilustración 2-2:	Aislamiento puro de <i>Metarhizium anisopliae</i>	7
Ilustración 3-2:	Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i> en lepidópteros	9
Ilustración 4-2:	Mecanismo de acción de las bacterias entomopatógenas	9
Ilustración 5-2:	Cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio LB de dos días a 28°C.	10
Ilustración 6-2:	Ciclo biológico de <i>Galleria mellonella</i>	12
Ilustración 7-2:	Crecimiento morfológico macroscópico de <i>P. fomesorozeus</i> (izquierda) y <i>B. bassiana</i> (derecha)	13
Ilustración 8-2:	Colonia pura de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
Ilustración 9-4:	Porcentaje de mortalidad de <i>G. mellonella</i> al quinto día de aplicar una concentración de 10^7 esporas/ml.	34
Ilustración 10-4:	Dosis letal 50 vs. Probabilidad de <i>Metarhizium</i> del sistema convencional.	35
Ilustración 11-4:	Dosis letal 50 vs. Probabilidad de <i>Beauveria</i> del sistema convencional	36
Ilustración 12-4:	Dosis letal 50 vs. Probabilidad de <i>Metarhizium</i> del sistema orgánico.	37
Ilustración 13-4:	Dosis letal 50 vs. Probabilidad de <i>Beauveria</i> del sistema orgánico.	38
Ilustración 14-4:	Anverso y reverso del aislamiento de <i>Beauveria</i> del sistema convencional.	39
Ilustración 15-4:	Anverso y reverso del aislamiento de <i>Metarhizium</i> del sistema convencional	40
Ilustración 16-4:	Anverso y reverso del aislamiento de <i>Metarhizium</i> del sistema orgánico.	40
Ilustración 17-4:	Anverso y reverso del aislamiento de <i>Beauveria</i> del sistema orgánico.	41
Ilustración 18-4:	Estructuras microscópicas de <i>Beauveria</i>	41
Ilustración 19-4:	Estructuras microscópicas de <i>Metarhizium</i>	42
Ilustración 20-4:	Secuenciación genética de <i>Beauveria bassiana</i>	42
Ilustración 21-4:	Secuenciación genética de <i>Metarhizium anisopliae</i>	43

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL SITIO EXPERIMENTAL
- ANEXO B:** TOMA DE MUESTRAS DE SUELO ORGÁNICO Y CONVENCIONAL
- ANEXO C:** CRIANZA Y ALIMENTACIÓN DE *G. mellonella*
- ANEXO D:** COLOCACIÓN Y RECUPERACIÓN DE LARVAS DE *G. mellonella* AL CABO DE 10 DÍAS
- ANEXO E:** PRESENCIA DE MICELIO EN CADÁVERES DE *G. mellonella*
- ANEXO F:** AISLAMIENTO DE HONGOS Y BACTERIAS
- ANEXO G:** SUSPENSIONES DE 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 ESPORAS/ML
- ANEXO H:** LARVAS DE *G. mellonella* INFECTADAS CON *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.
- ANEXO I:** CONTEO DE ESPORAS/ML DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.
- ANEXO J:** CONTEO DE BACTERIAS/ML CON LA ESCALA MCFARLAND
- ANEXO K:** CEPAS PURAS DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.
- ANEXO L:** ESTRUCTURAS DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana* AL MICROSCOPIO.
- ANEXO M:** SECUENCIA GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*
- ANEXO N:** NCBI BLAST PARA LA SECUENCIACION GENETICA DE *Beauveria bassiana*
- ANEXO O:** SECUENCIA GENÉTICA DE *Metarhizium anisopliae*
- ANEXO P:** NCBI BLAST PARA LA SECUENCIACION GENETICA DE *Metarhizium anisopliae*

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar microorganismos entomopatógenos de dos sistemas de producción agrícola familiar (orgánico-convencional) de la comunidad Gaushi, para ello se tomaron muestras compuestas de suelo mediante la técnica de muestreo en ele (L). Para la infección inducida se aplicó el método “cebo-insecto” propuesta por Zimmermann, 1986 adaptada por Meyling, 2007 obteniéndose 19 aislamientos de hongos y 10 de bacterias con características entomopatógenas de un total de 173 aislamientos y para su análisis estadístico se aplicó un DCA bifactorial. Para la selección de los aislamientos más efectivos se realizaron pruebas de mortalidad con suspensiones de 10 a las siete bacterias/ml y esporas/ml durante 5 y 14 días respectivamente. En cuanto a la dosis letal (DL) 50 y TL 50 se trabajó con concentraciones escalonadas desde 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 esporas/ml y para su análisis estadístico se utilizó Probit. Para los aislamientos efectivos se realizó la caracterización morfológica y molecular. Los aislamientos de mayor efectividad presentaron una mortalidad del 100 por cierto al quinto día y estos fueron GSCC3R2-A1 con una DL50 $1,87 \times 10$ a las ocho esporas/ml y GSOC2R2-A1 con una DL50 de $5,34 \times 10$ a las ocho esporas/ml correspondientes a *Beauveria bassiana*, GSCC2R2-A5 con una DL50 de $4,44 \times 10$ a las ocho esporas/ml y GSOC3R2-A3 con una DL50 de $3,09 \times 10$ a las ocho esporas/ml correspondiente a *Metarhizium anisopliae*, dichas especies se pudo corroborar mediante los análisis moleculares. En conclusión, gracias a este estudio se afirma que en los sistemas de producción agrícola familiar de esta comunidad existe la presencia de microorganismos entomopatógenos siendo estos una alternativa local para el control biológico ante el ataque de plagas que merman la productividad agrícola de la zona, por lo tanto, se recomienda incluir los aislamientos de mayor efectividad obtenidos en la elaboración de bioinsumos.

Palabras clave: <MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS>, <HONGOS>, <BACTERIAS>, <*Beauveria bassiana*>, <*Metarhizium anisopliae*> <CONTROL BIOLÓGICO>.



Ing. Cris... Castillo

1102-DBRA-UPT-2023



SUMMARY

This research aimed to isolate and characterize entomopathogenic microorganisms from two family farming systems (organic-conventional) in *Gaushi* community. Composite soil samples were taken using the L-sampling technique. The "bait-insect" method proposed by Zimmermann, 1986 adapted by Meyling, 2007 was applied for the induced infection getting 19 fungal and 10 bacterial isolates with entomopathogenic characteristics from a total of 173 isolates. For statistical analysis, a bifactorial Complete Randomized Design DCA was applied. Mortality tests were carried out with suspensions of 10 to seven bacteria/ml and spores/ml for 5 and 14 days respectively to select the most effective isolates. For the lethal dose (LD) 50 and TL 50, concentrations ranging from 10^6 , 10^7 , 10^8 and 10^9 spores/ml were used, and Probit was used for statistical analysis. For effective isolates, morphological and molecular characterization was performed. The most effective isolates showed a 100% mortality on the fifth day and these were GSCC3R2-A1 with a LD50 of 1.87×10 at eight spores/ml and GSOC2R2-A1 with a LD50 of 5.34×10 at eight spores/ml corresponding to *Beauveria bassiana*, GSCC2R2-A5 with an LD50 of 4.44×10 at eight spores/ml and GSOC3R2-A3 with an LD50 of 3.09×10 at eight spores/ml corresponding to *Metarhizium anisopliae*. These species could be confirmed by molecular analysis. It is concluded that in the family agricultural production systems of this community there is the presence of entomopathogenic microorganisms, and these are considered as a local alternative for the biological control against the attack of pests reducing the agricultural productivity of the area, therefore, it is recommended to include the isolates of greater effectiveness obtained in the elaboration of bio inputs.

Keywords: <MICROORGANISMS ENTOMOPATHOGENS>, <FUNGI>, <BACTERIAS>, <*Beauveria bassiana*>, <*Metarhizium anisopliae*>, <BIOLOGICAL CONTROL>.



Esthela Isabela Colcha Guashpa

0603020678

INTRODUCCIÓN

El uso y aplicación indiscriminada de fertilizantes químicos preocupa a nivel mundial porque provoca daños a nuestra salud, medio ambiente y seguridad alimentaria, por lo tanto, la agricultura moderna debe incrementar la productividad sin afectar nuestros recursos mediante soluciones sostenibles debido a que el suelo es la principal fuente microbiana altamente diversa optando así por un control biológico (CB) (Viera Arroyo et al., 2020 p. 129) que da inicio en el siglo XIX (Badii et al., 2006 p. 82) para restaurar el desequilibrio ecológico usando organismos vivos que causan los organismos perjudiciales; los estudios se enfocan más en los microorganismos entomopatógenos (ME) como es el caso de los hongos (Gómez et al., 2014).

El incremento frutícola y hortícola en Ecuador, Perú, Chile, México, Costa Rica y Colombia se dio entre 2005 y 2012 (Morero Miranda et al., 2019), sin embargo, la producción hortícola en Ecuador tiene gran éxito en el mercado local e internacional, específicamente las provincias con mayor producción son Tungurahua (640 ha), Chimborazo (366 ha) y Pichincha (68 ha) (León Paredes, 2015).

De acuerdo con (Gama et al., 2008 p. 25) los ME son conocidos hace 2 milenios y tiene la capacidad de reducir poblaciones de insectos plagas en un corto periodo de incubación por su alto índice de esporulación e infección directa mediante la cutícula, según (Ortíz , 2021 p. 11) menciona que *Galleria mellonella* es una de las plagas más utilizadas para su aislamiento y pertenece al orden de los lepidópteros. Según (Pacheco et al., 2019 p. 6) los ME se clasifican principalmente en hongos y bacterias, (INTAGRI, 2021) reporta que los géneros de los hongos con mayor frecuencia de uso agrícola son *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Trichoderma* y de bacterias es *Bacillus*, específicamente *B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. moritai*.

El presente trabajo de investigación forma parte del Proyecto de vinculación generación e implementación de alternativas tecnológicas para los sistemas de producción agropecuario forestales de la agricultura familiar. Dentro de esto de considero dos sistemas de cultivo: orgánico y convencional.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Tanto la fertilización orgánica como inorgánica son complementarias, sin embargo, en la actualidad la aplicación desordenada de agroquímicos provoca el deterioro de los recursos naturales y la preocupación tanto de agricultores como de ambientales, además el recurso económico es un factor limitante. En este contexto La Fundación Maquita Cushunchic trabaja por el beneficio del comercio justo ayudando a los sectores más vulnerables; en la provincia Chimborazo, cantón Riobamba, colabora con la parroquia Calpi en la cual está la comunidad San José de Gaushi que presenta una asociación de 21 familias con la agricultura familiar sustentable, en dicha zona existe una baja rentabilidad económica para los agricultores ya que dichos sistemas de producción no cuentan con alternativas locales de control biológico ante el ataque de plagas que merman la productividad agrícola.

1.2 Objetivos

1.2.1 *General*

- Aislar y caracterizar microorganismos entomopatógenos en dos sistemas de producción agrícola familiar representativos de la comunidad Gaushi.

1.2.2 *Específicos*

- Aislar microorganismos entomopatógenos presentes en sistemas de producción agrícola familiar de la comunidad Gaushi.
- Seleccionar los aislamientos de mayor efectividad.
- Caracterizar de forma morfológica y molecular los microorganismos seleccionados.

1.3 Justificación

No existe información acerca del aislamiento y caracterización de microorganismos entomopatógenos a partir de muestras compuestas de suelo en sistemas orgánicos y convencionales de la agricultura familiar en la comunidad Gaushi, por lo tanto, se pretende obtener información verídica sobre los tipos de hongos y bacterias entomopatógenas presentes para una aplicación como inóculo en abonos orgánicos en un futuro porque según (Pacheco et al., 2019) reportan que esto mejora las propiedades físicas del medio edáfico, combatir y reducir poblaciones de los insectos plaga.

Con el presente trabajo de investigación se aspira aislar y caracterizar microorganismos entomopatógenos presentes a partir de muestras compuestas de suelo en sistemas de producción agrícola familiar orgánico y convencional útiles para mermar el ataque de plagas e incrementar la productividad agrícola y rentabilidad económica en la comunidad Gaushi empleando el método de trapeo con *Galleria mellonella* del cuarto instar.

1.4 Hipótesis de investigación

1.4.1 Hipótesis nula

- No se aisló ni caracterizó ningún microorganismo entomopatógeno a partir de las muestras de suelo de los sistemas de producción agrícola familiar de la comunidad Gaushi.

1.4.2 Hipótesis alterna

Al menos se aisló y caracterizó un microorganismo entomopatógeno a partir de las muestras de suelos de los sistemas de producción agrícola familiar de la comunidad Gaushi.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Microorganismos entomopatógenos

2.1.1 Generalidades

El manejo y uso inadecuado de agroquímicos provoca resistencia a plagas y enfermedades en los diferentes cultivos, por lo cual los agricultores optan por incrementar la dosis o mezclar productos, siendo esto más peligroso para la salud humana y ambiente; debido a esto (Pacheco et al., 2019) reportan que el control biológico es una alternativa prometedora porque aquellos bio insumos enriquecidos con microorganismos entomopatógenos ayudan con el control de plagas, favorece la protección ambiental y tiene un costo más accesible para los productores.

Gracias a estudios realizados por la FAO se sabe que el 40% de las pérdidas se debe a la presencia de plagas y (Ramírez et al., 2019) reportan la presencia de aproximadamente 50 mil insectos a nivel mundial descritos y solo el 10% afectan a la producción agrícola; para reducir dicho porcentaje se recomienda el uso de microorganismos benéficos como hongos y bacterias ya que (Litwin et al., 2020 p. 23) afirman que estos son insecticidas biológicos, afectando también a los ácaros y garrapatas (Dara, 2017).

Los microorganismos son patógenos para algunos insectos debido a que tienen la capacidad de generar enfermedades y provocar su muerte, estos se clasifican en hongos, bacterias, nemátodos y virus, siendo los más estudiados los dos primeros (Pacheco et al., 2019).

2.1.2 Clasificación

Pocos son los productos registrados en programas de manejo integrado de plagas, sin embargo, existe un sin número de microorganismos entomopatógenos como es el caso de los hongos y bacterias que prometen resultados satisfactorios en el control de insectos (Altimira, 2020).

2.1.2.1 Hongos

Son microorganismos capaces de infectar y matar artrópodos, generalmente son utilizados como bioplaguicidas ya que son una alternativa a los agroquímicos para la agricultura ecológica (Lovett

et al., 2017 p. 1). Por otra parte, (Araújo et al., 2016) manifiestan que existen 6 Phylum las cuales son: *Oomycetes* (12 sp), *Chytridiomycota* (65sp), *Microsporidia* (339 sp), *Entomophthoromycota* (474 sp), *Basidiomycota* (238 sp) y *Ascomycota* (476 sp) de las cuales la cuarta y sexta clase son naturalmente las más frecuentes, además *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria. bassiana* *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lecanicillium lecani* pertenecen al phylum ascomycota.

Conforme a lo mencionado por (García et al., 2011) se dice que los HE (hongos entomopatógenos) tienen la capacidad de infectar una extensa clase de hospederos mientras que otros presentan limitaciones; en este sentido, *B. bassiana* y *M. anisopliae* logran infectar aproximadamente 100 especies diversas de insectos plagas, entre ellas tenemos al orden de los lepidópteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, himenópteros.

Según (McGuire et al., 2020) *Beauveria* y *Metarhizium* se pueden encontrar ya sea en el suelo como en plantas y de manera endofítica, en la superficie de la raíz se ve colonizada con facilidad por estas dos especies de tal forma que arman asociaciones endófitas y posterior a ello *M. robertsii* tiene la capacidad de transmitir nitrógeno a la planta procedente del insecto. Ambos entomopatógenos presentan vínculos ente plantas hospedantes y simbiosis benéfica además de controlar poblaciones de insectos plaga, por lo tanto, se puede usar como insecticida biológico, sin embargo, es necesario tener un amplio conocimiento sobre especies endémicas para mayor efectividad.

2.1.2.1.1 *Ciclo de vida*

Por lo general su ciclo de vida inicia al germinar las esporas y posteriormente su penetración en el hospedero mediante la cutícula, luego se da la multiplicación de las células fúngicas en la parte interna del insecto plaga provocando así su muerte, a continuación, se puede o no dar la producción de esporas no móviles o con estructuras resistentes mismos que necesitan un periodo de inactividad (Albuquerque et al., 2018 p. 215).

2.1.2.1.2 *Mecanismos de acción*

Según (Gómez et al., 2014) reportan que realmente no se puede puntualizar el o los mecanismos que intervienen entre la interacción del insecto y el hongo, sin embargo, gran parte de tienden a infectar a los hospederos mediante la cutícula; al ponerse en contacto el insecto y los conidios del hongo entomopatógeno procede a infectarlo y consecuentemente a matarlo, las 9 fases son: adhesión, germinación, penetración, multiplicación, producción, muerte, colonización, esporulación y diseminación.

De acuerdo con (Téllez et al., 2009 pp. 75-77) el modo de acción empieza germinado las esporas en la cutícula del insecto, luego penetran mediante procesos físicos y químicos con una duración de 8 a 12 horas, después en su interior se multiplican los conidios, las hifas engrosan y se ramifican en los tejidos para crear micelio, posteriormente producen toxinas con propiedades insecticidas que degradan los tejidos para infectar y colonizar en su totalidad el cuerpo del insecto y esto tarda de 3 a 8 horas para su muerte, a continuación se da la emergencia y esporulación que requiere una humedad relativa mayor al 90% para llegar a zonas poco esclerosadas y finaliza con la diseminación a través de diferentes vectores, tales como el hombre, animales, viento o lluvia.

2.1.2.1.3 Principales hongos entomopatógenos

- *Beauveria bassiana*

Según lo explica (Sandón, 2016) pertenece al phylum Ascomycota, orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae y (Pedrini., 2022 pág. 1) manifiesta que tiene la capacidad patogénica a 1000 especies de insectos plaga siendo su principal característica provocar una enfermedad en insectos denominada muscardina blanca la cual en lo posterior cubrirá todo su cuerpo con una capa algodonosa gracias a su micelio y esporas lo cual provoca su momificación (Ortiz , 2021 pp. 3-4).

La parte reproductora de esta especie son los conidióforos las cuales están inmersas en las hifas septadas siendo esta su manifestación, al principio su color es blanco-amarillo, pero al finalizar su crecimiento y desarrollo se torna de color crema (Noboa et al., 2015) además, (Gómez et al., 2014) añade que al cultivarlo en el medio PDA las colonias son más polvorientas y presentan una esporulación abundante.

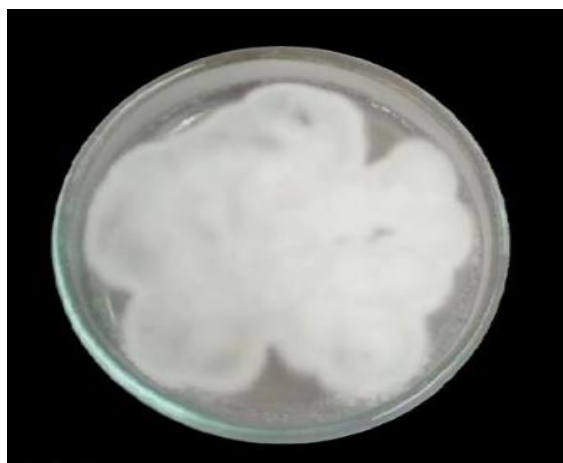


Ilustración 1-2: Aislamiento puro de *Beauveria bassiana*

Fuente: (Bustamante , 2019)

- *Metarhizium anisopliae*

De acuerdo con (Vázquez, 2022) esta especie pertenece al phylum Ascomycota, orden Hypocreales y familia Clavicipitaceae. A nivel de laboratorio es recomendable aislar en el medio PDA debido a su desarrollo eficiente, generalmente sus colonias son circulares, al principio el micelio es de color blanco, sin embargo, conforme va esporulando este presenta varios colores, los anillos que se forman en el reverso de color amarillento mientras que en el anverso son de color verde-olivo.

Los conidióforos de esta especie presentan ramificaciones y son de forma cilíndrica u ovalada, la parte basal de la cadena es blanca, pero con el paso de los días dichas estructuras van madurando y toman un color verde siendo este su color característico, aunque también pueden ser verde olivo, amarillo verdoso o intenso; se desarrollan bien en el medio PDA, SDA a 26°C, es un buen controlador de plagas importantes como son el gusano blanco y las palomillas de la col (Gómez et al., 2014).

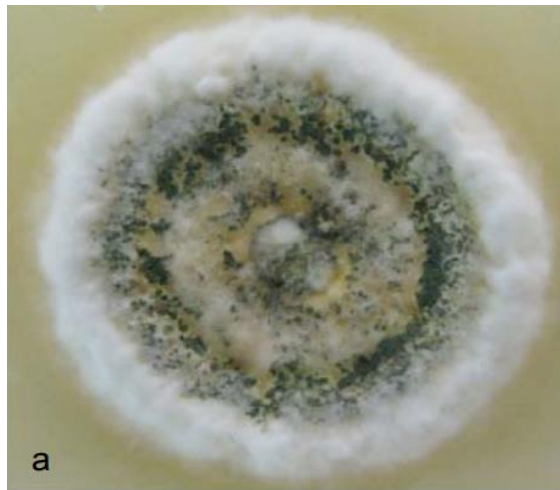


Ilustración 2-2: Aislamiento puro de *Metarhizium anisopliae*

Fuente: (García et al., 2011)

2.1.2.2 Bacterias

De acuerdo con (López et al., 2004 pág. 16) estos son organismos unicelulares y (Sauka et al., 2021) mencionan que estos son las que más se estudian y utilizan en todo el mundo por lo que presentan un alto potencial como agente de CB contra insectos plaga, los géneros bacterianos más empleados en el campo agrícola para el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) son *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* y *Lysinibacillus*. Por otro lado, según (INTAGRI, 2021) menciona que las especies utilizadas con mayor frecuencia en programas de manejo integrado son: *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* y *B. moritai*.

El mismo autor menciona que estos entomopatógenos tienden a atacar en estadios larvarios y en base a sus hábitos al igual que su grado de infección estos pueden clasificarse en obligados, facultativos y potenciales, además (Ramírez et al., 2019) mencionan que existe alrededor de 90 especies bacterianas que son las generadoras de enfermedades que infectan a los insectos plaga.

De acuerdo con lo mencionado por (Grijalba et al., 2019) las bacterias entomopatógenas tienden a clasificarse en Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En cuando a las Gram-positivas tienen forma de bacilos y cocos, además la producción de esporas resistentes a condiciones desfavorables hace que sean empleados a nivel de invernadero o campo abierto; por otro lado, en lo que confiere a su modo de acción producen toxinas. Siendo la más común Cry que pertenece a *Bacillus thuringiensis*, la cual afecta al intestino y pasa a la hemolinfa del insecto para esporular y matarlo.

El mismo autor, en cuando a las bacterias Gram-negativas menciona que estas a pesar de no producir no esporas, también tienen forma de bacilos y cocos, dichas bacterias son ubicuos y se aísla a partir de insectos ya sean enfermos o muertos; a pesar de su facilidad para ser aislados sus esporas no presentan estructuras resistentes y estudios han demostrado que además, existen efectos patogénicos en la mortalidad de los insectos porque la posibilidad que sean consideradas como oportunistas.

2.1.2.2.1 *Ciclo de vida*

Se da en 2 fases, la de crecimiento vegetativo y la esporulación, en la primera fase estas tienen a proliferarse mediante bipartición en un periodo de 30 a 90 minutos ya que va a depender del medio artificial que se está utilizando y durante la segunda fase se da el cambio de la bacteria a conidio mediante un programa de diferenciación (López et al., 2004 p. 18).

Casi todas las cepas de *Bacillus thuringiensis* generan cristales proteicos cuando esporulan y estos son expulsados al exterior, gracias a la actividad insecticida que presenta provoca la muerte del insecto en aproximadamente 48 horas, dicho cristal está formado por las familias de toxinas conocidas como Cry (*Crystak*) y Cyt (*Cytolitic*), por otro lado estas toxinas pueden determinar su especificidad y cuando el insecto ingiere el cristal este se solubiliza debido al pH del intestino y de forma proteolítica se transforma en fragmentos tóxicos (Grijalba et al., 2019).

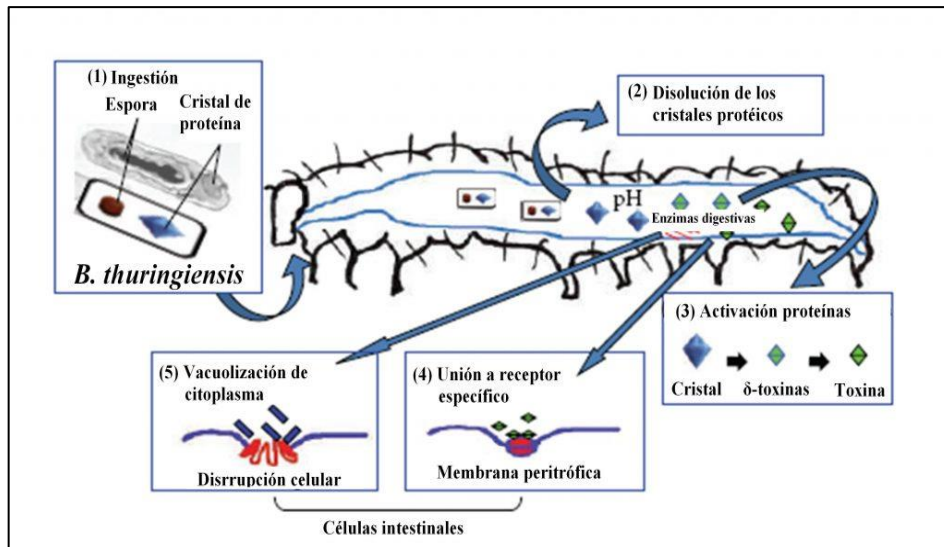


Ilustración 3-2: Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* en lepidópteros

Fuente: (Yentzen Group, 2018).

2.1.2.2.2 Mecanismos de acción

La muerte de los insectos plaga mediante bacterias se da a través de su alimentación por parte de productos contaminados, aunque existen otras especies que actúan como patógenos oportunistas invadiendo el cuerpo del insecto con lesiones mecánicas; las proteínas Cry de *B. thuringiensis* presentan cristales, ingresan y solubilizan en la parte intestinal liberando aquellas proteínas cristalinas en forma de protoxinas que al ser sintetizadas produce toxinas activas que provocan la muerte en estado larval (Sauka et al., 2021). De acuerdo con lo reportado por (Jiménez García, 2019 p. 12) el insecto va perdiendo de a poco su apetito y muere en un periodo de 12 horas y 5 días.

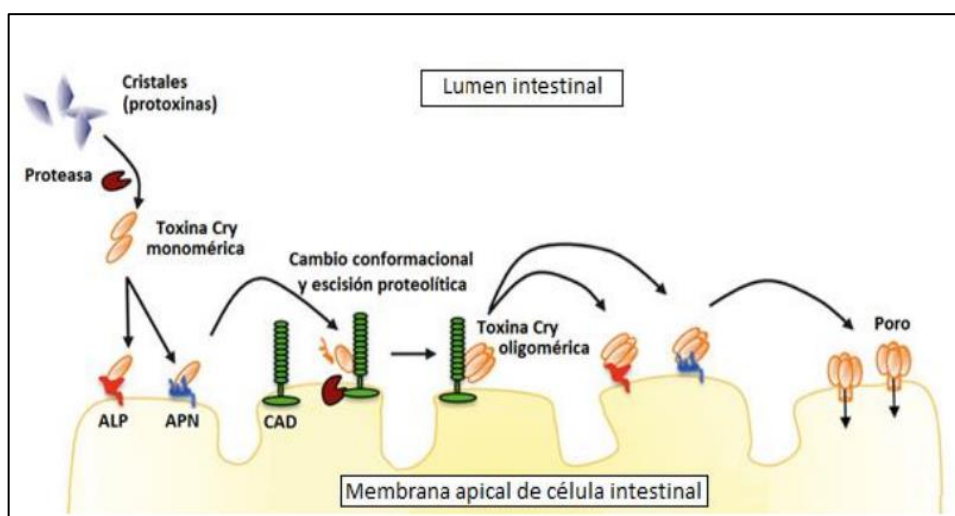


Ilustración 4-2. Mecanismo de acción de las bacterias entomopatógenas

Fuente: (Sauka et al., 2021)

2.1.2.2.3 Principales bacterias entomopatógenas

- *Bacillus thuringiensis*

Según (Castillo et al., 2022) esta especie es empleada con mayor frecuencia en el control biológico de plagas en el ámbito agrícola y salud pública por su capacidad de elaborar proteínas con propiedad insecticida, mismas que se sintetizan y presentan esporulaciones que se encuentran en un cristal paraesporal de manera exclusiva; se dice que aquellas esporas que se logren pulverizar en conjunto con dichos cristales son más seguros que los pesticidas sintéticos debido a que la contaminación microbiana fluctúa entre 75 a 95%.

De acuerdo con su clasificación pertenece al orden Bacillales, familia Bacillaceae y fue descrita por Berliner, 1915 (Carrera, 2009) y al ser una bacteria gran positiva tiene una longitud que oscila entre 3 a 5 micrómetros y un ancho entre 1 a 1,2 micrómetros, su principal característica es la producción de esporas resistentes elipsoidales sin causar hinchazón del perfil bacilar (Sauka et al., 2021).



Ilustración 5-2: Cultivo de *Bacillus thuringiensis* en medio LB de dos días a 28°C.

Fuente: (Oliveira da Silva et al., 2017).

2.1.3 Métodos de aislamiento

En base a lo mencionado por (Galán, 2012 p. 22) *B. bassiana* y *M. anisopliae* resultan ser las especies más estudiadas debido a su efectividad y fácil multiplicación, la principal fuente de inóculo son las plantas, medio edáfico e insectos y requiere de medio artificial como Agar Papa Dextrosa (PDA), además se habla de tres métodos de aislamiento: diluciones seriadas, directo y trampeo con *Galleria mellonella*.

2.1.3.1 Aislamiento por dilución seriada

Se necesita tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,01% para colocar 1 mL de la solución que se obtuvo al colocar el insecto con micelio en un recipiente con 10 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,01% y agitarlo en el vortex por 60 segundos con anterioridad, repetir dichos pasos hasta obtener 5 diluciones en serie; para la siembra en cajas Petri con medio PDA se toma 0,1 mL de las concentraciones 10^{-5} y 10^{-6} e incubar a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ durante 8 días aproximadamente (Monzón et al., 2021 p. 37).

2.1.3.2 Aislamiento directo

Una vez que el insecto este cubierto de micelio, se toma un poco de micelio con una aguja previamente desinfectada para hacer la siembra directa en el medio artificial, en el caso de los hongos se utilizara PDA y en el caso de las bacterias se usa el aza y se hace la siembra en estriado en el medio Agar Nutriente, todos los aislamientos obtenidos se los debe incubar a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ durante 8 días aproximadamente para hongos y entre 24 a 48 horas para bacterias (Ibarra et al., 2002 p. 130).

2.1.3.3 Aislamiento usando *Galleria mellonella*

Esta técnica fue descrita por Zimmermann, 1996 y adaptada por (Meyling, 2007) en la cual se utilizan larvas de *G. mellonella* del cuarto instar y se coloca en 150 g de suelo en tarrinas plásticas y se almacena durante 7 días a temperatura ambiente; posteriormente se recuperan los cadáveres y se los desinfecta con hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos para luego colocar en recipientes de plástico con papel filtro humedecido con agua destilada esterilizada, sellarlo, rotularlo e incubarlo a temperatura ambiente por 7 días para observar crecimiento micelial, finalmente se toma un poco de micelio y se siembra en cajas Petri que contengan medio PDA con cloranfenicol e incubar 7 días o más para que haya presencia de colonias (Carbonero et al., 2014 pp. 7-8).

2.1.3.3.1 *Galleria mellonella*

Este insecto trampa es una de las técnicas que se utiliza con mayor frecuencia para el aislamiento de entomopatógenos, este insecto denominado polilla de cera es una plaga que pertenece al orden de los lepidópteros y afecta los apiarios ya que destruye y reduce las colonias de manera muy significativa (Quintana, 2017 p. 2); sin embargo, gracias a *Galleria mellonella* se han obtenido resultados favorables al hacer evaluaciones de *B. bassiana* y *Metarhizium* (Restrepo García et al., 2019 p. 74).

2.1.3.3.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con (Ortíz, 2021) la polilla de cera denominada también *Galleria mellonella* como su nombre científico pertenece al phylum Arthropoda, clase insecta, orden Lepidoptera y familia Pyralidae.

2.1.3.3.3 Ciclo biológico

Según (Ortíz, 2021) a nivel de laboratorio y estando en constante humedad y temperatura elevada, su ciclo de vida no es muy largo y tiene una duración de mes y medio. Inicia cuando los adultos depositan huevecillos en las celdas de las colmenas y tarda 4 días de pasar de larval a emergencia; al cabo de 19 días dicha larva se desarrolla y se encuentra apta para la fase de empupado, pero debe estar a una temperatura de 32°C ya que caso contrario el proceso tarda entre 4 a 5 meses. Finalmente, al doceavo día se convierte en adulto y sale de su capullo para continuar reproduciéndose y empezar su ciclo otra vez.

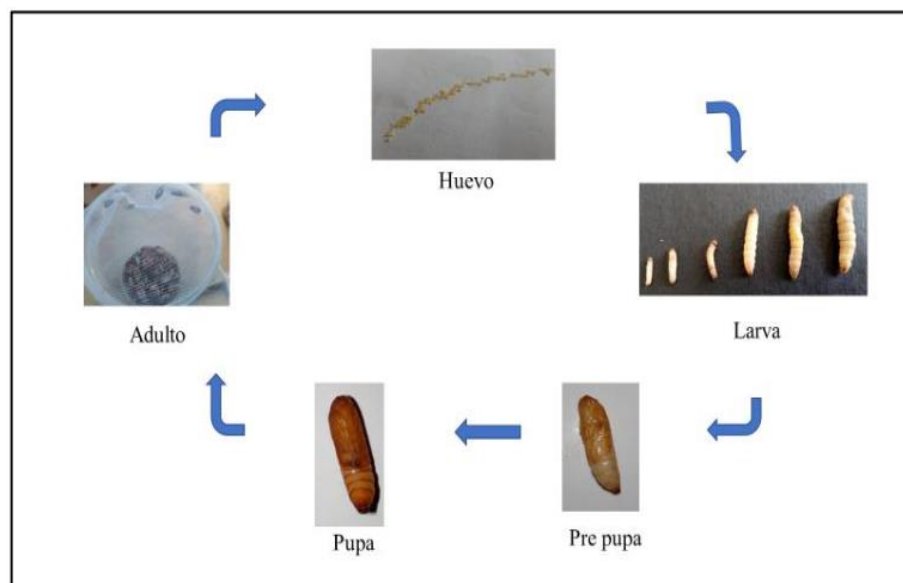


Ilustración 6-2: Ciclo biológico de *Galleria mellonella*

Fuente: (Marquina Bazán et al., 2017 p. 66).

2.1.4 Caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos

2.1.4.1 Macroscópica

Se lo hace mediante la observación directa de los cultivos monospóricos de hongos o bacterias entomopatógenas, en el caso de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* inicialmente son de coloración blanca, pero con el paso de los días este se va tornando amarillento y algodonoso, por otro lado, el anverso de estas presenta un color rojizo. En la ilustración 7-2 se aprecia la morfología de las colonias, en la parte izquierda esta *P. fumosoroseus* y en la derecha está *B. bassiana* (Cañedo et al., 2004 pp. 35-37).

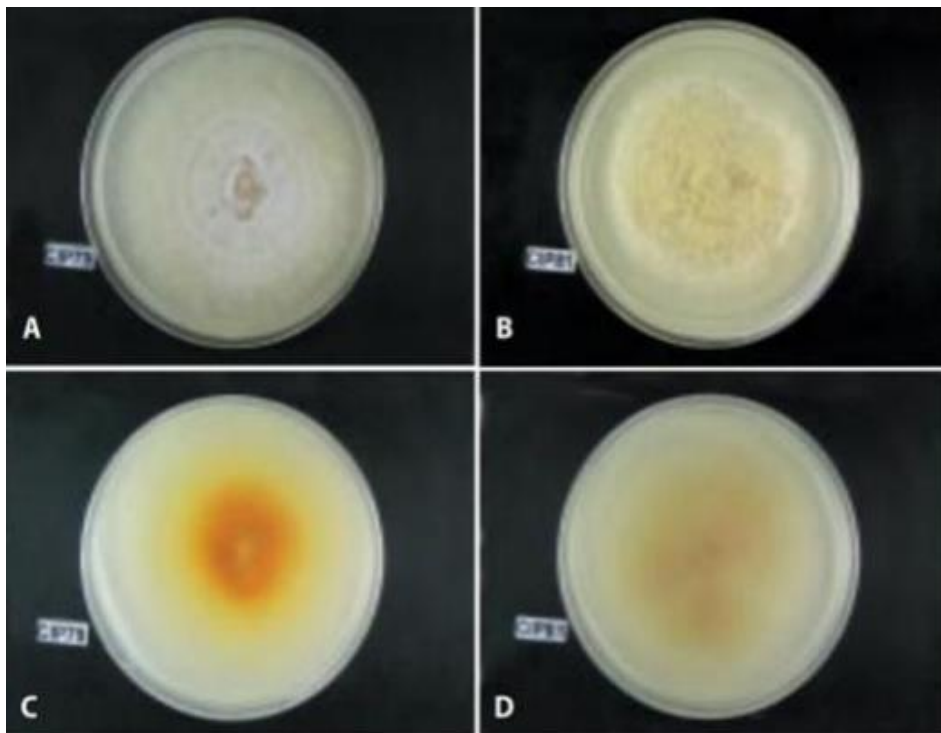


Ilustración 7-2. Crecimiento morfológico macroscópico de *P. fumosoroseus* (izquierda) y *B. bassiana* (derecha)

Fuente: (Cañedo et al., 2004 pp. 35-37).

En cuanto a las colonias de *Metarhizium anisopliae* presentan una coloración verdosa o amarillenta misma que con el pasar del tiempo se va oscureciendo, esto en la parte frontal, mientras que en el anverso presenta una coloración marrón o verdosa y generalmente la textura es polvosa o algodonosa (Gómez et al., 2014).

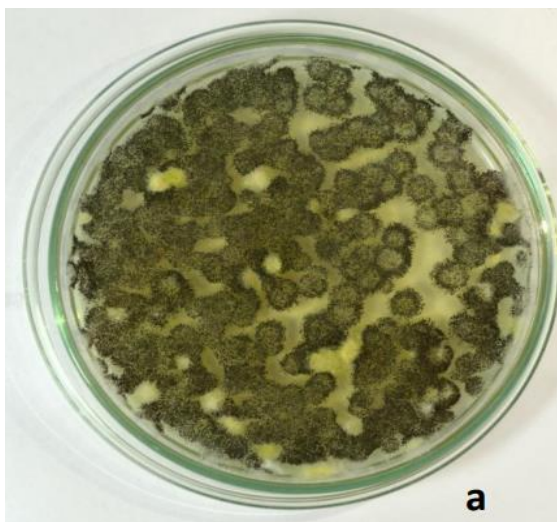


Ilustración 8-2: Colonia pura de *Metarhizium anisopliae*.

Fuente: (Contreras et al., 2020).

2.1.4.2 Microscópica

Se observan las tipologías de hifas, micelio, conidios y ramificaciones de cada uno de los HE. En el caso de *B. bassiana* los conidios tiene un diámetro de 2 micras las cuales presentan células conidiógenas mismas que cuentan con ramificaciones que forman un raquis con una longitud de 20 micras que sirven de soporte para los conidios (Ortíz , 2021).

El mismo autor, reportan que los conidios de *P. fomesoroseus* se encuentran en la parte terminal y tienen un largo de 100 micras, sobre estas están se encuentra otra estructura denominada 15ialides las cuales son en forma ovalada y forman grupos entre 3 a 6 con una longitud de 6 micras y finalmente los conidios que están en la parte apical son de forma semi circular ya que tienen un diámetro de 4x2 micras.

En cuanto a *M. anisopliar* los conidios en cada septo presentan ramificaciones, estos tienen una longitud de 7 micras, sus 15ialides son cilíndricas con un largo de 10 micras, por otra parte, sus esporas son unicelulares, cilíndricos y truncados en forma de cadena de color verde y la longitud de estos conidios es de 6,25 micras (Lozano, 2007).

2.1.4.3 Molecular

Según lo mencionado por (González et al., 2021) primero se debe realizar la extracción del ADN genómico de los aislados seleccionados empleando un kit de purificación de ADN, para dicha amplificación se hace uso de ITS (espaciador transcrito interno) por PCR (Reacción de la Cadena

Polimerasa) con cebadores o primers acordes, posteriormente se lleva a cabo 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, luego se hace la hibridación a 55°C durante 1 minuto y finalmente la polimerización a 72°C durante 45 segundos.

El mismo autor también hace mención que las técnicas ITS para su amplificación se lleva a cabo utilizando los cebadores ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') y además se hace uso de 30 ciclos de desnaturalización la cual se da a una temperatura de 94°C durante 45 segundos.

2.1.5 *Uso potencial*

El uso excesivo de agroquímicos ha sido un problema para el medio ambiente y para el hombre, sin embargo, para reducir dichos problemas una de las alternativas es el control biológico ya que gracias a ello se puede incrementar las producciones agrícolas y además contrarrestar poblaciones de insectos plagas con ayuda de enemigos naturales ya sean parásitos o depredadores (FAO, 2022).

En el Ecuador existe gran cantidad de bosques nativos de pequeña y gran magnitud en los cuales muy probablemente haya la presencia de hongos entomopatógenos mismos que pueden ser utilizados como agentes de biocontrol, (Evans, 1993 p. 45) afirma que los micoinsecticidas tiene un gran potencial sobre el desarrollo de la humanidad y alternativa química ya que además se pueden generar insecticidas, fungicidas y bactericidas en beneficio del área médica y agrícola como controladores biológicos.

De acuerdo con (Dara, 2017) el control con hongos benéficos se hace en un largo periodo de tiempo ya que son controladores microbianos contra plagas, sin embargo, para ello primero las agencias gubernamentales importan microorganismos exóticos, luego realizan pruebas rigurosas y exhaustivas para finalmente liberarlos sobre plagas invasoras; bajo este mismo contexto es necesario entender su forma de actuar y su interacción entre el patógeno, el insecto y la planta para aplicar de forma exitosa dichos productos a base de microorganismos entomopatógenos para controlar plagas a nivel agrícola y hortícola.

2.2 *Agricultura familiar*

2.2.1 *Generalidades*

Este término tiene diferentes conceptos, pero la FAO, 2014 define a la agricultura familiar como aquellas actividades agrícolas rurales distribuyendo los productos agrícolas, forestales, pesqueros, pastoriles y acuícolas como administrador de un hogar dependiente de la mano de obra ya sea hombre o mujer (Cordero Montes, 2022 p. 9).

Por otro lado, este término es categorizado en base a la producción/ha, obtenido así 4 clasificaciones de las pequeñas unidades productivas (PAF): infra subsistencia, subsistencia, intermedio y excedentario, los cuales pertenecen a los siguientes valores; menor a 0,5 ha, entre 0,5 a 2 ha, entre 2 a 5 ha y entre 5 a 10 ha respectivamente (Maletta, 2017 p. 51).

De acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) en Ecuador, el 55% del total de la UPAs corresponde al sistema de producción agrícola familiar, de estas el 26%, 64% y 10% corresponde a la Costa, Sierra y Amazonía respectivamente, sin embargo, gran parte de la producción familiar en la Costa está dirigida a la agroexportación y en la Sierra se dedica al autoconsumo (FAO, 2022 p. 5).

2.2.2 Origen

El concepto del sistema agrícola familiar se originó a finales del siglo XIX e inicios del siglo XX que provienen del planteamiento de Chayanov que tiene su teoría en la unidad económica campesina, aquí básicamente describe la organización, relación y vínculo con el sistema económico indicado y de tal forma dicha economía campesina es fortalecida por el trabajo familiar lo cual hace una gran diferencia en cuanto a las empresas capitalistas debido a que ellas están orientadas al valor del cambio (Salcedo et al., 2014 p. 18).

2.2.3 Importancia

De acuerdo con (Fundación Esquel, 2020) aproximadamente el 80% de los agricultores en nuestro país que está formado por pequeños y medianos productores que poseen entre una a veinte hectáreas para la producción para el mercado o autoconsumo, en este contexto la importancia de la agricultura familiar radica en la alimentación ya que en el Ecuador en el sector rural sustenta al 70% de la población y además (Martínez Valle, 2013 p. 7) menciona que es una fuente de empleo de segundo plano ya que de manera económica el Ecuador depende de la exportación del petróleo.

La agricultura familiar en post pandemia ha tenido gran relevancia ya que tanto la agricultura campesina como la agricultura indígena adquirió un valor estratégico por presentar una relación

estrecha entre la salud humana y la agricultura siendo un ingreso importante a nivel económico para nuestro país luego de la explotación petrolera (Fundación Esquel, 2020).

2.2.4 Beneficios

Según la (FAO, 2014 p. 8) menciona que, debido a la migración por parte de los jóvenes en el sector rural, la agricultura familiar cobra importancia y es más innovadora generando una producción agroecológica para de tal forma salvaguardar la seguridad alimentaria, seguridad económica y seguridad nutricional al igual que la salud del suelo, restauración de la biodiversidad y el reciclaje de los nutrientes que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la producción agrícola.

2.2.5 Clasificación

2.2.5.1 De subsistencia

En la agricultura familiar de subsistencia (AFS) no se contrata mano de obra y de acuerdo con lo mencionado por (Maroto, 2016) estos predios son utilizados para la producción agrícola del autoconsumo y los factores como la tierra, tecnología y capital no son suficientes para garantizar la subsistencia familiar.

2.2.5.2 De transición

En la agricultura familiar de transición (AFT) si se contrata mano de obra ocasional y en base a lo que menciona (Maroto, 2016) la producción en los predios está dirigida tanto al autoconsumo como también para el mercado.

2.2.5.3 Consolidada

También conocida por sus siglas AFC (Agricultura Familiar Consolidada) en el cual se debe contratar mano de obra de forma permanente y de acuerdo con lo mencionado por (MINAGRI, 2015), la diferencia que se presenta en este tipo de agricultura familiar es que posee sustento suficiente en la producción agrícola propia, los recursos como el suelo son explotados con mayor potencial, además los productos tienen acceso a los mercados generando excedentes para la capitalización de la unidad productiva.

2.2.6 Agroecología

Ciencia que promueve procesos en los agroecosistemas desde la comprensión, diseño e implementación de sistemas que requieren bajo nivel de insumos externos. Su estudio es desde el punto de vista ecológico con la finalidad de analizar procesos agrícolas globales y bajo diferentes dimensiones como es el aporte de conocimiento tradicional al desarrollo de la agroecología el cual proviene del conocimiento del campesino gracias a su entorno habitual se desenvuelven mejor bajo condiciones adversas además de generar estrategias para su trabajo (Venegas et al., 2018).

Estudia los sistemas agrícolas desde el punto de vista agronómico, ecológico y socio económico, su mayor enfoque está en la conservación y mejoramiento del medio ambiente debido a que ayuda a la recuperación agroecológica del sistema natural relacionándolo con los sistemas de producción, por otro lado, hay preocupación por la sociedad y su cultura en la cual están ubicados dichos sistemas por su interés en la producción y estabilidad ecológica de los agroecosistemas intervenidos (Venegas et al., 2018).

2.2.7 Huertos agroecológicos

Según el (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2015) son pequeños espacios dedicados a la producción sustentable de alimentos de manera saludable, orgánica y además brinda fertilidad al medio edáfico por tal motivo es recomendable tener conocimiento en base a la asociación y rotación de cultivos.

De acuerdo con (Tannfeld, 2011 p. 8) existen cuatro tipos de huertos: familiares, comunitarias, escolares y comerciales; el huerto familiar hace referencia aquellos que se lleva a cabo en los domicilios para el autoconsumo, el huerto comunitario está bajo el mando de alguna institución y aquí están involucradas grupos familiares, los huertos escolares se realizan en unidades educativas con ayuda de profesores y estudiantes con finalidades didácticas y finalmente los huertos comerciales que son aquellos con fines de lucro a nivel de mercado.

2.2.8 Manejo de huertos familiares

La viabilidad ecológica y económica de los agroecosistemas es fundamental además de su rentabilidad menciona (Colín et al., 2012 p. 14), es importante saber acerca del manejo de huertos agroecológicos porque involucra procesos desde la semilla hasta el consumo por lo que se puede sembrar y cosechar gran variedad de cultivos hortícolas ya sean tubérculos, leguminosas, cereales,

plantas medicinales y ornamentales, etc., por otro lado, es recomendable que este espacio se encuentre cerca de la vivienda para involucrar la participación de todos los integrantes ya sea en la siembra, mantenimiento y recolección (Huertas comunitarias et al., 2021 pp. 4-5).

Para el manejo del huerto familia se debe considerar la ubicación (lo más cercano al hogar), el terreno (sin pendientes muy pronunciadas), saber la cantidad y la distancia de los cultivos y empezar con aquellos que brinden aportes nutricionales, las podas son fundamentales en épocas de sequía ya sean de sanidad, formación o producción, la fertilización debe ser orgánica y para ello se puede usar estiércol animal, abonos verdes y abonera orgánica (rastros) y finalmente el control fitosanitario para lo cual se puede aprovechar propiedades insecticidas y fúngicas (FAO et al., 2015 pp. 7-8).

2.2.9 Bioinsumos

También son conocidos como biofertilizantes, bioestimulantes y bioplaguicidas, estos productos biológicos funcionan como fertilizante y son una alternativa complementaria al manejo convencional de cultivos, su materia prima son los microorganismos con la capacidad de mejorar el rendimiento, calidad y sanidad de los cultivos al momento de aplicarlos teniendo cuidado con el ambiente (Mamani de Marchese et al., 2018 pp. 13-14).

El mismo autor menciona que los bioinsumos son de origen microbiano, los biofertilizantes y biopesticidas presentan su efecto sobre el cultivo. Dentro de estas categorías existen subcategorías como es el caso de los fertilizantes ya que ahí se encuentran los bioestimulantes de crecimiento, inoculantes microbianos, bioestabilizadores, abonos orgánicos como el humus y guano; en cuanto a los biopesticidas se distinguen microbiocidas, bioinductores y biorepelentes.

2.2.10 Uso de los bioinsumos

Son de origen biológicos y en su fórmula están presentes los microorganismos como pueden ser el caso de los hongos, bacterias o virus de tal forma que mejora la productividad al igual que la salud de las plantas incluso las características biológicas del medio edáfico (Rocha, 2020).

Además, el mismo autor también menciona que hoy en día el mercado agrícola gracias a que está trabajando bajo los sistemas de producción familiar, está reduciendo el uso de productos químicos lo cual prácticamente se dice que los productos utilizados son amigables con el medio que nos

rodea y a su vez no generan efectos adversos y dichos productos presentan mayor eficiencia y sustentabilidad.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Características del lugar

3.1.1 Localización

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la comunidad San José de Gaushi en 6 parcelas con cultivos establecidos (Tabla 5-3) y en el Laboratorio de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH mismo que se encuentra ubicado en la parroquia Lizarzaburu, cantón Riobamba, provincia Chimborazo.

3.1.2 Ubicación geográfica

En la comunidad San José de Gaushi existen 21 familias que conforman una asociación misma que trabaja en conjunto con la fundación Maquita Cushunchic, dichas familias se dedican a la producción orgánica en huertos familiares. Según (PDOT, 2015) informa que en este sector los cultivos predominantes son maíz con 463 ha y cebada con 40 ha, en los meses de octubre y noviembre se dedican a la preparación de suelos para su posterior siembra y al cabo de 8 meses su cosecha. De estas familias, 3 de ellas fueron las beneficiarias para llevar a cabo la presente investigación y los otros 3 beneficiarios no forman parte de la asociación que trabaja en conjunto con la Fundación Maquita.

Tabla 1-3: Ubicación geográfica del sitio experimental. Comunidad San José de Gaushi, provincia de Chimborazo-Ecuador, 2022.

Ubicación	Descripción
Provincia	Chimborazo
Cantón	Riobamba
Parroquia	Calpi
Comunidad	San José de Gaushi
Altitud	3200 msnm
Coordenadas X	1,609806341
Coordenadas Y	78,7304
Sitio Experimental	Terreno comunal

Fuente: (PDOT, 2015) y (Valencia Ilbay, 2018 p. 23).

Realizado por: Ganan, I., 2023

3.1.3 Características climáticas

Las características del sitio experimental se detallan en las tablas 2-3.

Tabla 2-3: Características climáticas del sitio experimental - Gaushi.

Denominación	Datos
Temperatura (°C)	5 – 13
Precipitación anual (mm)	700
Humedad relativa (%)	65 - 85

Fuente: (Valencia Ilbay, 2018 p. 23) y (Plan Estratégico de Desarrollo Cantonal, 2019 p. 24)

Realizado por: Ganan, I., 2023

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Materiales de campo

- Muestras de suelo procedentes de los cultivos del sistema convencional y orgánico
- App GPS móvil
- Cámara fotográfica
- Fundas herméticas para la recolección de muestras compuestas de suelo
- Rapidografo
- Barreno
- Libreta de apuntes
- Bolígrafos
- Lápiz
- Borrador

3.2.2 Materiales de laboratorio

- Tarrinas plásticas con tapa, con capacidad de 1000 mL y 150 mL
- Taper plástico de 35,7 cm; 20 cm y 11,3 cm de largo, ancho y alto respectivamente.
- Papel absorbente
- Papel film

- Papel aluminio
- Alcohol
- Cloranfenicol
- Hielera
- Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Medio de cultivo Agar Nutriente

3.2.3 *Materiales de oficina*

- Ordenador
- Impresora
- Hojas de papel
- Flash memory

3.2.4 *Equipos de laboratorio*

- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Mechero
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Pinzas
- Asas
- Agujas
- Encendedor
- Incubadora
- Refrigeradora
- Frascos de vidrio transparentes con capacidad de 500 mL
- Balanza digital

3.3 *Métodos y técnicas*

Esta investigación se la realizó en dos fases: campo y laboratorio, a nivel de campo está el muestreo de suelos y crianza de *Galleria mellonella* y por otra parte en la fase de laboratorio están

los aislamientos, selección de los más efectivos y caracterización (morfológica y molecular) de microorganismos entomopatógenos.

3.3.1 Actividades que se desarrollaron en el área de estudio

3.3.1.1 Muestreo de suelos

Se eliminó 1m de los bordes de la parcela y estas muestras fueron tomadas de la rizosfera a 20 cm de profundidad de cada uno de los lotes y cultivos seleccionados (Tabla 5-3) tanto para el sistema convencional como para el sistema orgánico, dicho muestro se realizó en forma de ele (L) del cual se tomó aproximadamente 1 kg de suelo en fundas ziploc con su respectiva etiqueta, cabe recalcar que las herramientas utilizadas como el barreno y una palita jardinera fueron desinfectadas con alcohol para tomar las muestras de uno y otro lote. Posteriormente las muestras fueron colocadas en un cooler y transportadas al laboratorio a una temperatura de 4°C.

3.3.1.2 Crianza de Galleria mellonella

Las polillas de cera (*Galleria mellonella*) en estado larval fueron obtenidas del Centro Experimental Tunshi, se colocaron en recipientes plásticos y fueron alimentadas con cera de abejas. Cuando ya fueron mariposas se las pasó a otros recipientes plásticos y fueron alimentadas con agua endulzada con azúcar morena, para ello a la tapa del recipiente se hizo un agujero rectangular de 20 cm de largo y 8 cm de ancho, sobre este se colocó papel absorbente con la solución de azúcar durante el tiempo necesario hasta que pongan huevecillos y pasen al estado larval donde ya pueden ser utilizadas para los ensayos.

3.3.1.3 Análisis físico químico de las muestras de suelo en estudio

Las muestras de suelo obtenidas fueron de 2 kg cada una, estas fueron previamente etiquetadas y luego enviadas al laboratorio de suelos del INIAP las cuales trabajaron bajo sus propias metodologías.

3.3.2 Actividades que se desarrollaron en el laboratorio de Ciencias Biológicas

3.3.2.1 Colocación de Galleria mellonella en las muestras de suelo

Cada muestra compuesta de suelo obtenida de las diferentes parcelas de cultivos representativos de la comunidad San José de Gaushi fue dividida en 3 partes iguales, en cada una se colocaron 10 *Gallerias* y 60 mL de agua esterilizada. Cada recipiente fue humedecido de acuerdo con la necesidad y temperatura durante los próximos 10 días.

3.3.2.2 Recuperación de cadáveres de Galleria mellonella

Se desinfectó el área de trabajo con alcohol al 75% y se colocó la muestra de suelo con los cadáveres, la recuperación de cadáveres se hizo a los 10 días después y se colocó en recipientes plásticos previamente esterilizados y desinfectados, luego se lavó estos cadáveres 3 veces en agua y una en alcohol, a continuación con ayuda de las pinzas esterilizadas se colocó cada cuerpo recuperado en frascos términos plásticos el cual tenía papel absorbente humedecido en la base, finalmente se codificó y se agrupó de acuerdo a su tratamiento y repetición. Siguiendo la misma línea, este proceso se repitió para cada muestra, tratamiento y cultivo.

3.3.2.3 Registro de datos

Una vez transcurrido 10 días desde la recuperación de cadáveres se registró los datos mediante observación directa. Algunos cadáveres tenían la presencia de crecimiento micelial, mientras que en otros cadáveres eran blandos y/o presentaban mal olor.

3.3.2.4 Aislamiento de hongos y cultivos puros

Se preparó el medio de cultivo PDA y por cada 500 mL de agua esterilizada se requiere de 20 gramos de PDA y 0,5 de cloranfenicol y se puso autoclavar, posteriormente en la cabina de flujo laminar se hizo el dispensado en cajas Petri y una vez solidificado el medio se tomó una muestra del cadáver y se hizo la siembra del hongo con ayuda de la aguja de disección, luego se codificó, selló con papel film y se colocó en la incubadora a 28°C.

Para las copias de seguridad se tomó cepas puras y con la aguja previamente desinfectada tomamos un poco de medio PDA y damos un ligero toquecito en el micelio puro, luego colocamos en los tubos de ensayo, se sella con papel film y codifica.

3.3.2.5 Aislamientos de bacterias y cultivos puros

Se inició preparando el medio de cultivo Agar Nutriente (AN), por cada 1 L de agua esterilizada se colocan 25 gramos de AN y se puso autoclavar, por consiguiente, en la cabina de flujo laminar se hace el dispensado del medio en cajas Petri.

Una vez solidificado el medio se tomó el cadáver del insecto con cuerpo blando y/o mal olor con ayuda de una pinza desinfectada y se colocó en un vaso con alcohol y se dejó reposar por unos cuantos segundos, luego de ello se sacó el cuerpo y con el asa bacteriológica desinfectada se raspa el cuerpo y se toma una muestra para hacer la siembra en las cajas Petri en forma de estriado compuesto con la finalidad de obtener el crecimiento de 1 o 2 bacterias y fácilmente cultivarlas nuevamente y así obtener cultivos puros.

3.3.2.6 Selección de aislamientos más efectivos

Para ello se realizó pruebas de mortalidad con aquellos aislamientos altamente sospechosos de ser entomopatógenos y para cada uno se requirió de 15 larvas de *G. mellonella* las cuales fueron lavadas con la suspensión de esporas que se encontraba en los tubos de ensayo con ayuda de una brocha y se colocó 5 larvas de *G. mellonella* en cada recipiente con papel absorbente húmedo.

3.3.2.7 Conteo de esporas/ml

Se preparó placas con las suspensiones de esporas (0,2 ml) en la cámara de Neubauer con ayuda de la micropipeta y se llevó a cabo el respectivo conteo de los conidios a nivel microscópico. Para este cálculo se contabilizó las esporas en la cabina de Neubauer y se aplicó la fórmula: $\sum X_{1-5} * 250000 * FD$, siendo FD el factor de dilución (10^1).

3.3.2.8 Escala McFarland

Se utilizó la escala 0,5 McFarland con la finalidad de obtener suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, para ello, se hizo uso de 3 tubos de ensayo y reactivos como el Ácido sulfúrico (98%) y Cloruro de Bario.

Para preparar la solución McFarland 0.5 se agregó 85 ml de la solución preparada anteriormente de H_2SO_4 en un frasco de 100 ml, luego con ayuda de una micropipeta se agregó 0,5 ml de la solución previamente preparada de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ gota a gota mientras se agitaba el frasco, posteriormente se aforó al 100 ml con la solución de H_2SO_4 y se mezcló hasta que no haya precipitados visibles, finalmente se fraccionó de manera similar dicha solución en los tubos de

ensayo para preparar los inóculos bacterianos mismos que son de 3 a 5 ml. Las escalas utilizadas fueron 0,5, 9 y 10 que corresponde a $1,5 \times 10^8$; $2,7 \times 10^9$ y 3×10^9 UFC/ml respectivamente.

Tabla 3-3: Escala McFarland 0,5.

Mc Farland	BaCl ₂ 1% (p/v)	H ₂ SO ₄ 1% (v/v)	UFC/ml
0,5	0,05	99,5	$1,5 \times 10^8$
1	0,1	9,9	3×10^8
2	0,2	9,8	6×10^8
3	0,3	9,7	9×10^8
4	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$
5	0,5	9,5	$1,5 \times 10^9$
6	0,6	9,4	$1,8 \times 10^9$
7	0,7	9,3	$2,1 \times 10^9$
8	0,8	9,2	$2,4 \times 10^9$
9	0,9	9,1	$2,7 \times 10^9$
10	1	9,0	3×10^9

Fuente: (McFARLAND, 1907)

Realizado por: Ganan, I., 2023

Para hacer el conteo se procedió a colocar las tres muestras de la escala McFarland en una gradilla para hacer las comparaciones respectivas con los tubos de ensayo que contienen las células bacterianas visibles y en el fondo se colocó la tarjeta Wickerham adaptada.

3.3.2.9 Observación de esporas a nivel microscópico

En una placa se colocó una gota de azul de metileno, una muestra de micelio con esporas y se mezcló hasta dispersarlo muy bien. Luego se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio para caracterizar sus estructuras.

3.3.2.10 Determinación de la Dosis y Tiempo letal 50 con los aislamientos más efectivos

Se preparó la suspensión de esporas de cada aislamiento que fue efectivo a partir de la multiplicación masiva de hongos, luego se realizó el respectivo conteo de esporas/ml utilizando la cámara de Neubauer y con ayuda de un microscopio, una vez determinado esto y confirmado que tenga una concentración de 10^9 esporas/ml se procede hacer las infecciones a las larvas de *G. mellonella* de 3 repeticiones con 5 larvas cada uno, por cada tratamiento. Para hacer la

infección con una concentración de 10^8 esporas/ml se procede bajar la suspensión y realizar el mismo proceso de infección y siguiendo esta misma línea se lleva a cabo con la concentración de 10^7 y 10^6 esporas/ml. Finalmente se evalúa durante 14 días, pero los controles se hicieron al tercero, quinto y séptimo día.

3.3.3 Factores en estudio

- **Factor A:** sistemas de cultivo (orgánico y convencional)
- **Factor B:** cultivos (C1, C2, C3) para cada sistema

3.3.4 Unidad experimental

La unidad experimental de los microorganismos aislados se detalla en la tabla 4-3.

Tabla 4-3: Especificaciones de las unidades experimentales a nivel de laboratorio.

Especificaciones	Cantidad
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	18

Realizado por: Ganan, I., 2023

3.3.5 Tratamientos

Los tratamientos en estudio de los microorganismos aislados se detallan en la tabla 5-3.

Tabla 5-3: Especificaciones de los tratamientos en estudio.

Tratamientos	Codificación	Especificaciones
T1	GSOC1	Cultivo 1 (Policultivo: haba , frejol y cebolla)
T2	GSOC2	Cultivo 2 (Policultivo: cebolla , col y brócoli)
T3	GSOC3	Cultivo 3 (Policultivo: col , calabaza y coliflor)
T4	GSCC1	Cultivo 1 (Brócoli)
T5	GSCC2	Cultivo 2 (Col)
T6	GSCC3	Cultivo 3 (Habas)

G=Gaushi, SO=Sistema Orgánico, SC= Sistema convencional.

Realizado por: Ganan, I., 2023

3.3.6 Diseño experimental

El diseño experimental que se aplicó para los microorganismos aislados fue un DCA Bifactorial, con tres repeticiones por tratamiento (Factor A x Factor B) en estudio.

3.3.7 Análisis estadístico

Para el análisis del número de larvas de *G. mellonella* muertas recuperadas con presencia de sintomatología se aplicó un DCA bifactorial con 6 tratamientos (Factor A x Factor B) y 3 repeticiones.

El análisis de los aislamientos más efectivos se determinó mediante pruebas de mortalidad con 3 repeticiones y la concentración de 10^7 esporas/ml sobre 5 larvas de *G. mellonella* al quinto día.

Para la Dosis y Tiempo Letal 50 se aplicó una suspensión de esporas/ml con tres repeticiones y concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 sobre larvas de *G. mellonella* del cuarto instar con y se utilizó análisis Probit con Microsoft Excel.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Procesamiento, análisis e interpretación de resultados

4.1.1 Propiedades fisicoquímicas de las muestras de suelo

En la tabla 6-4, se detalla las propiedades tanto físicas como químicas de los suelos de los sistemas de cultivos (orgánico y convencional).

Tabla 6-4: Propiedades fisicoquímicas del sitio experimental – Gausi.

Muestra	Textura	MO (%)	CE (dS/m)	DA (g/cm ³)	pH	N	P ppm	K
GSOC1	Arena Franca	1,6 ^B	0,77 ^{NS}	1,59	7,7 ^{LAI}	14,5 ^B	98,3 ^A	649,06 ^A
GSOC2		3,9 ^M	0,77 ^{NS}	1,53	7,4 ^{PN}	15,6 ^B	166,8 ^A	492,66 ^A
GSOC3		1 ^B	0,38 ^{NS}	1,51	7,5 ^{LAI}	8,3 ^B	63,7 ^A	101,66 ^A
GSCC1	Franco- Arenoso	1,5 ^B	0,73 ^{NS}	1,56	7,3 ^{PN}	12,1 ^B	104,6 ^A	184,6 ^A
GSCC2		1,2 ^B	0,74 ^{NS}	1,47	7,1 ^{PN}	10,8 ^B	97,5 ^A	167,4 ^A
GSCC3		1,3 ^M	0,42 ^{NS}	1,53	7,4 ^{PN}	9,3 ^B	77,6 ^A	193,7 ^A

A: Alto, M: Medio, B: Bajo, LAI: Ligeramente alcalino, PN: Prácticamente Neutro, NS: No Salino.

Fuente: Estación Experimental Del Austro, Laboratorio de Manejo de Suelos y Aguas, 2022

Realizado por: Ganan, I., 2023

Como se puede apreciar en la tabla 6-4, los dos sistemas presentan una textura arenosa, conductividad eléctrica no salina, densidad aparente entre 1,47 y 1,59 g/cm³, pH ligeramente alcalino y neutro, los niveles nitrógeno (N) son bajos a diferencia del fósforo (P) y potasio (K) probablemente el N se pierde por volatilización y el P y K por lixiviación, mientras que el porcentaje de materia orgánica (MO) es mayor en el sistema orgánico.

4.1.2 Número de microorganismos aislados

Tabla 7-4: Cantidad de hongos y bacterias encontradas en el SO y SC

Tratamiento	Codificación	Total	Hongos	Bacterias
T1	GSOC1		19	11
T2	GSOC2	86	15	13
T3	GSOC3		9	19
T4	GSCC1		17	13
T5	GSCC2	87	20	8
T6	GSCC3		14	15

Realizado por: Ganan, I., 2023

Como se puede observar en la Tabla 7-4, se obtuvo una totalidad de 173 aislamientos, 86 pertenecen al sistema orgánico; en el cultivo 1 se obtuvo 30 aislamientos, siendo 19 hongos y 11 bacterias; en el cultivo 2 se obtuvo 28 aislamientos, siendo 15 hongos y 13 bacterias y en el cultivo 3 se obtuvo 28 aislamientos, siendo 9 hongos y 19 bacterias. Por otro lado, en cuanto al sistema convencional se obtuvo 87 aislamientos, en el cultivo 1 se obtuvo 30 aislamientos, siendo 17 hongos y 13 bacterias, en el cultivo 2 se obtuvo 28 aislamientos, siendo 20 hongos y 8 bacterias y finalmente en el cultivo 3 se obtuvo 29 aislamientos de los cuales 14 son hongos y 15 son bacterias.

Tabla 8-4: ANOVA para el número de larvas muertas recuperadas de *G. mellonella* por la presencia de microorganismos.

F.V.	S.C	gl	C.M	F	p-valor	significancia
Total	8,28	17				
Factor A: Sistemas	0,06	1	0,06	0,12	0,7342	Ns
Factor B: Cultivos	1,44	2	0,72	1,59	0,2523	Ns
Repetición	2,11	2	1,06	2,32	0,1490	Ns
Interacción	0,11	2	0,06	0,12	0,8865	Ns
Error	4,56	10	0,46			
CV	7,02%					

ns: no hay diferencia significativa ($p > 0,05$); **= si hay diferencia significativa ($p < 0,05$)

Realizado por: Ganan, I., 2023

Como se puede apreciar en la tabla 8-4, de acuerdo con el número de larvas muertas recuperadas de *G. mellonella* por la presencia de microorganismos no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados.

4.1.3 Número de especies entomopatógenas aisladas

Tabla 9-4: Número de especies entomopatógenas encontradas.

Tratamientos	Codificación	Hongos
T1	GSOC1	1
T2	GSOC2	5
T3	GSOC3	1
T4	GSCC1	1
T5	GSCC2	9
T6	GSCC3	2
TOTAL		19

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la tabla 9-4 se detalla el número de hongos entomopatógenos aislados a partir de muestras compuestas de suelo de un sistema orgánico y un sistema convencional; en total de aisló 19 hongos; en el tratamiento 1 existe la presencia de 1 hongo, en el tratamiento 2 existe la presencia de 5 hongos, en el tratamiento 3 existe la presencia de 1 hongo, en el tratamiento 4 existe la presencia de 1 hongo, en el tratamiento 5 existe la presencia de 9 hongos y en el tratamiento 6 existe la presencia de 2 hongos. Estos resultados indican que solo hay presencia de hongos entomopatógenos en los suelos del sistema convencional, específicamente en el cultivo 2 que corresponde al cultivo de col en la comunidad San José de Gaushi.

4.1.4 Aislamientos de mayor efectividad

4.1.4.1 Número de esporas/mL

Tabla 10-4: Número de esporas/ml encontrados en los aislamientos

Codificación	Concentración de esporas/mL
GSCC2R2-A4	8,40E+07
GSCC2R2-A3	3,00E+08
GSCC2R3-A5	9,50E+07
GSCC2R2-A1	2,80E+08
GSCC3R2-A1	3,50E+08
GSCC2R2-A2	6,90E+07
GSCC2R1-A2	2,20E+07
GSCC2R2-A5	3,40E+08
GSCC2R1-A3	9,70E+07
GSCC2R2-A6	4,00E+07

GSCC3R3-A1	2,80E+07
GSCC1R3-A1	1,50E+07
GSOC1R2-A3	3,70E+08
GSOC3R2-A3	3,80E+08
GSOC1R3-A2	3,20E+08
GSOC2R2-A1	4,20E+08
GSOC3R3-A3	2,30E+08
GSOC2R1-A3	1,40E+08
GSOC1R1-A2	3,20E+08

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la tabla 10-4 se puede apreciar el número de esporas por mililitro que fueron encontradas en los diferentes aislamientos, evidenciando así que los valores más altos en cuanto al sistema convencional son: 3,50E+08 y 3,40E+08 mientras que del sistema orgánico son: 3,80E+08 y 4,20E+08 por lo cual, estos son aquellos aislamientos que presentan mayor efectividad ya que a mayor número de concentración de esporas por mililitro, menor será el tiempo letal del insecto plaga.

Tabla 11-4: Número de bacterias/ml encontrados en los aislamientos

Codificación	# bacterias/mL
GSCC1R3 - A2B	2,70E+09
GSCC1R1 - A4B	1,40E+08
GSCC1R3 - A1B	2,70E+09
GSCC1R1 - A1B	2,70E+09
GSCC2R1 - A7B	2,70E+09
GSCC2R1 - A2B	1,50E+08
GSCC3R2 - A1B	2,70E+09
GSCC3R3 - A4B	1,40E+08
GSOC1R2 - A2B	2,70E+09
GSOC3R1 - A1B	1,50E+08

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la tabla 11-4 se puede apreciar el número de bacterias por mililitro que fueron encontradas en cada uno de los aislamientos, básicamente en teoría aquellos que tienen el valor de 2,70E+09 deberían ser aquellos que presenten mayor efectividad debido a que tiene una concentración alta y por ende matará más rápido a las larvas de *Galleria mellonella*. para este cálculo se utilizó la escala McFarland con referencia a los valores de $1,5 \times 10^9$; $2,7 \times 10^9$ y 3×10^9 UFC/ml.

4.1.4.2 Porcentaje de mortalidad

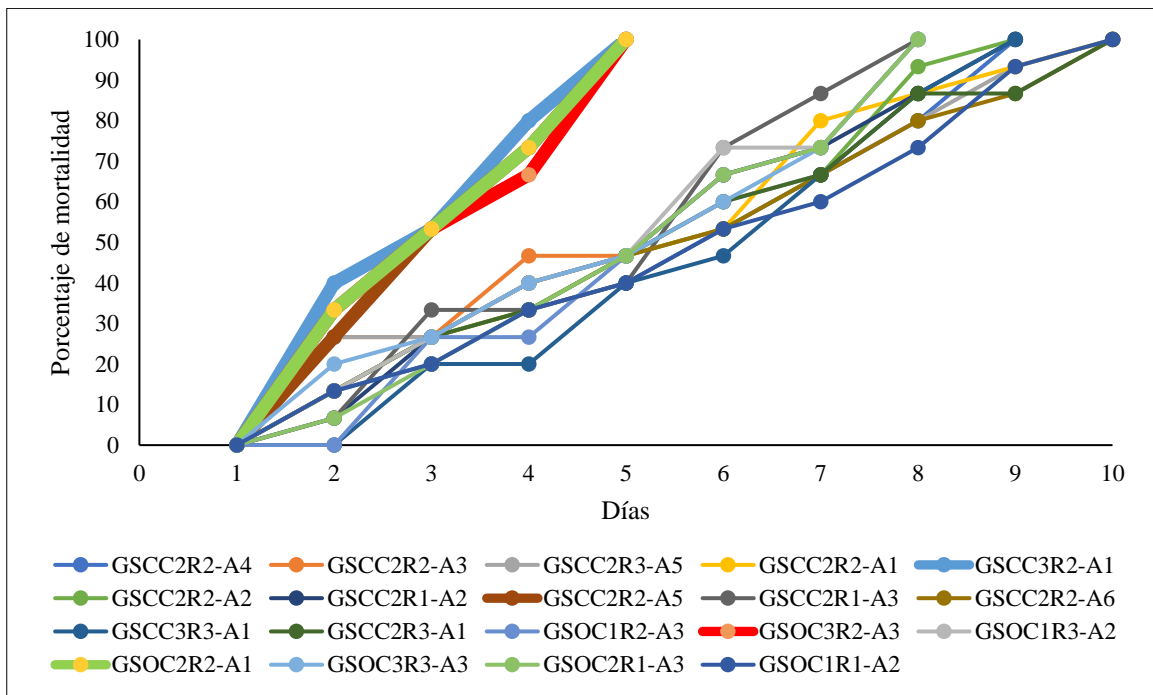


Ilustración 9-4: Porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* al quinto día de aplicar una concentración de 10^7 esporas/ml.

Realizado por: Ganan, I., 2023.

En la ilustración 9-4 se puede apreciar el porcentaje de mortalidad de *Galleria mellonella* luego de haber sido infectadas una concentración de 10^7 esporas/ml, los aislamientos de mayor efectividad fueron: GSCC3R2-A1, GSCC2R2-A1, GSOC2R2A1 y GSOC3R2-A3 debido a que al quinto día presentó una mortalidad del 100%, mientras que los otros aislamientos a partir del octavo día presentaron una mortalidad superior al 60%.

4.1.4.3 Dosis Letal 50

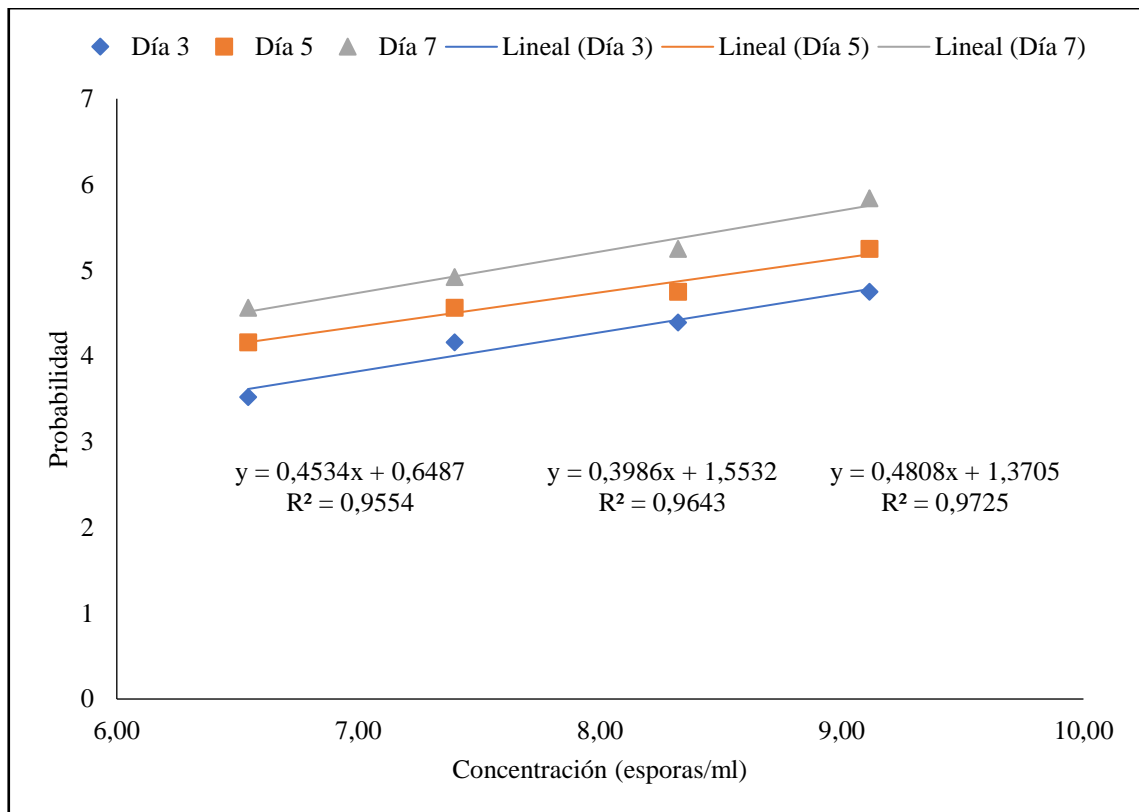


Ilustración 10-4: Dosis letal 50 vs. Probabilidad de *Metarhizium* del sistema convencional.

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 10-4 se puede apreciar la dosis letal 50 del aislamiento GSCC2R2-A5 sobre larvas de *Galleria mellonella* de manera gráfica, con la relación entre la concentración de esporas/ml y la probabilidad se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,95; 0,96 y 0,97 y una concentración letal de $3,95 \times 10^9$, $4,44 \times 10^8$ y $3,54 \times 10^7$ esporas/ml al tercer, quinto y séptimo día respectivamente.

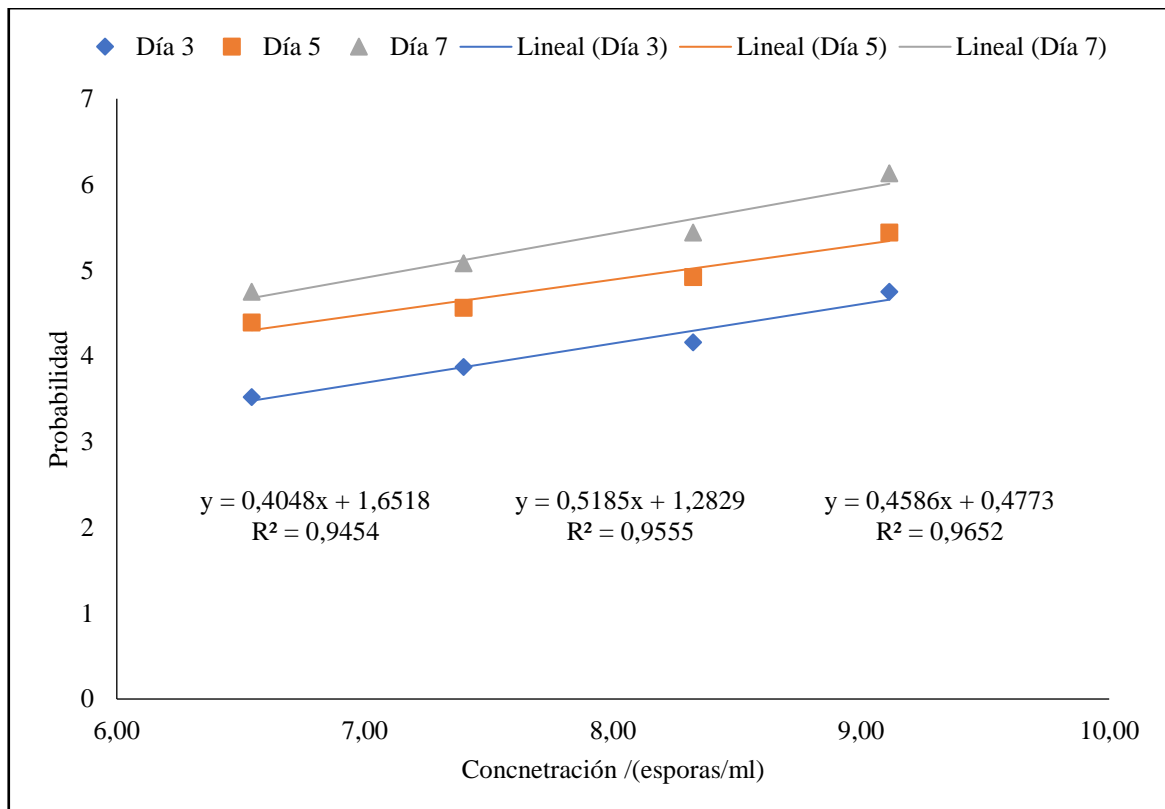


Ilustración 11-4: Dosis letal 50 vs. Probabilidad de *Beauveria* del sistema convencional

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 11-4 se puede apreciar la dosis letal 50 del aislamiento GSCC3R2-A1 sobre larvas de *Galleria mellonella* de manera gráfica, con la relación entre la concentración de esporas/ml y la probabilidad se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,94; 0,95 y 0,96 y una concentración letal de $7,28 \times 10^9$, $1,87 \times 10^8$ y $1,48 \times 10^7$ esporas/ml al tercer, quinto y séptimo día respectivamente.

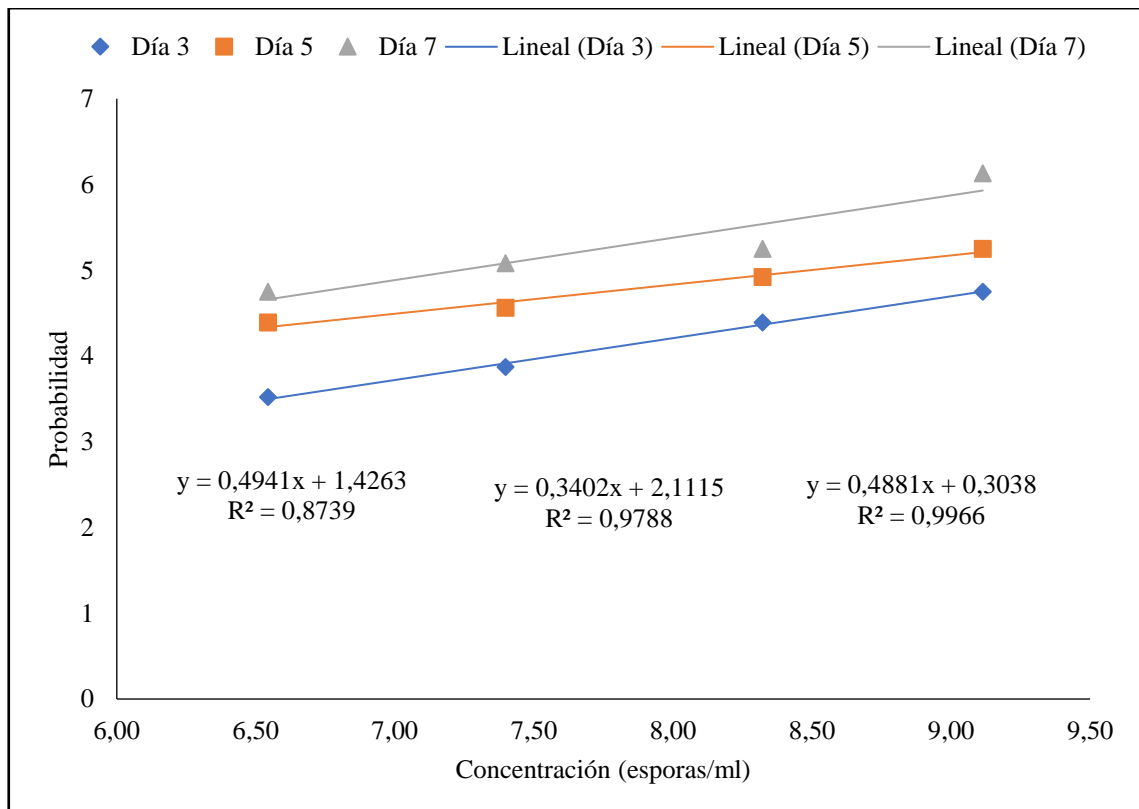


Ilustración 12-4: Dosis letal 50 vs. Probabilidad de *Metarhizium* del sistema orgánico

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 12-4 se puede apreciar la dosis letal 50 del aislamiento GSOC3R2-A3 sobre larvas de *Galleria mellonella* de manera gráfica, con la relación entre la concentración de esporas/ml y la probabilidad se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,87; 0,97 y 0,99 y una concentración letal de $4,18 \times 10^9$, $3,09 \times 10^8$ y $1,71 \times 10^7$ esporas/ml al tercer, quinto y séptimo día respectivamente.

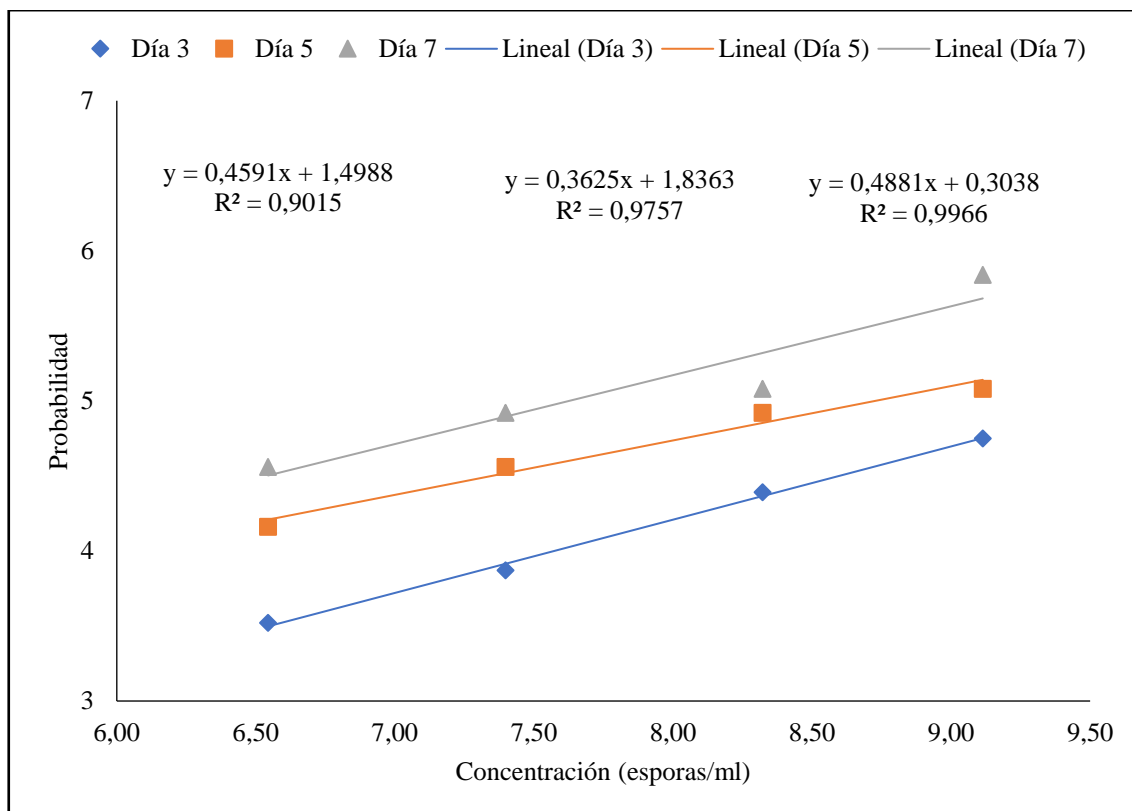


Ilustración 13-4: Dosis letal 50 vs. Probabilidad de *Beauveria* del sistema orgánico

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 13-4 se puede apreciar la dosis letal 50 del aislamiento GSOC2R2-A1 sobre larvas de *Galleria mellonella* de manera gráfica, con la relación entre la concentración de esporas/ml y la probabilidad se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,90; 0,97 y 0,99 y una concentración letal $4,18 \times 10^9$, $5,34 \times 10^8$ y $4,23 \times 10^7$ esporas/ml al tercer, quinto y séptimo día respectivamente.

4.1.4.4 Tiempo Letal 50

Tabla 12-4: Tiempo letal 50 para los tratamientos más efectivos.

Tratamientos	Días		
	3	5	7
GSCC3R2-A1	7.28E+09	1.87E+08	1.48E+07
GSCC2R2-A5	3.95E+09	4.44E+08	3.54E+07
GSOC3R2-A3	4.18E+09	3.09E+08	1.71E+07
GSOC2R2-A1	4.18E+09	5.34E+08	4.23E+07

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la tabla 12-4 se puede apreciar los tiempos letales para los aislamientos más efectivos al tercer, quinto y séptimo día, el aislamiento GSCC3R2-A1 requiere una concentración de

$7,28 \times 10^9$, $1,87 \times 10^8$ y $1,48 \times 10^7$ esporas/ml respectivamente, el aislamiento GSCC2R2-A5 requiere una concentración de $3,95 \times 10^9$, $4,44 \times 10^8$ y $3,54 \times 10^7$ esporas/ml respectivamente, el aislamiento GSOC3R2-A3 requiere una concentración de $4,18 \times 10^9$, $3,09 \times 10^8$ y $1,71 \times 10^7$ esporas/ml respectivamente y finalmente el aislamiento GSOC2R2-A1 requiere una concentración de $4,18 \times 10^9$, $5,34 \times 10^8$ y $4,23 \times 10^7$ esporas/ml respectivamente.

4.1.5 Caracterización morfológica y molecular

4.1.5.1 Descripción macroscópica

- **T5:** GSCC3R2-A1 (*Beauveria*): **Anverso:** presentó una forma circular, borde entero, elevación cumbonada, color blanco, textura algodonosa con un diámetro de 2,1 cm a los 8 días y 3,9 cm a los 15 días después del aislamiento. **Reverso:** color beige con estrías en la parte central.

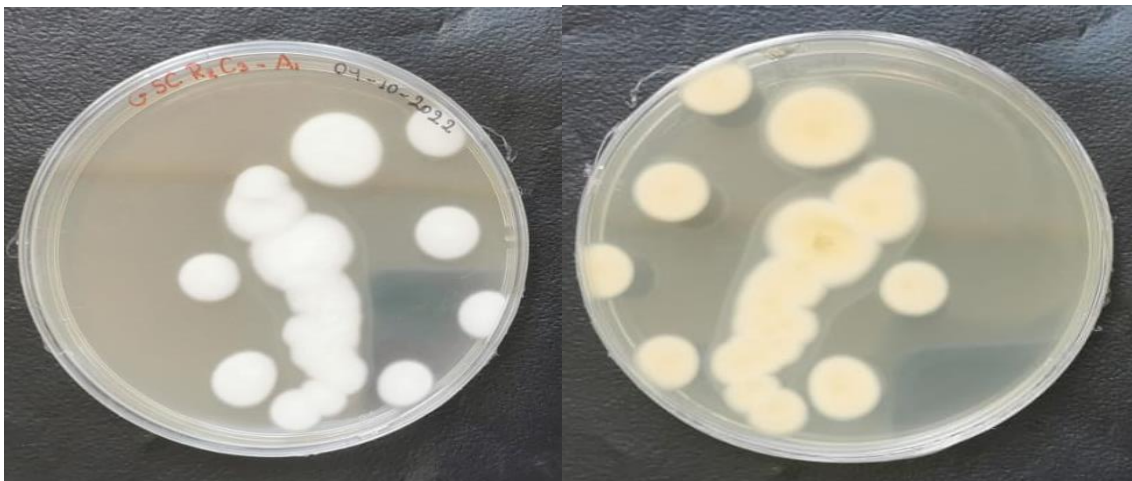


Ilustración 14-4: Anverso y reverso del aislamiento de *Beauveria* del sistema convencional.

Realizado por: Ganan, I., 2023

- **T8:** GSCC2R2-A5 (*Metarhizium*): **Anverso:** presentó una forma irregular, borde ondulado, elevación convexa, color blanco en el borde seguido de amarillento y en la parte central un verde olivo, presenta anillos, textura algodonosa y un diámetro de 2,2 cm a los 8 días y 4,2 cm a los 15 días después del aislamiento. **Reverso:** color beige y con estrías en la parte central.

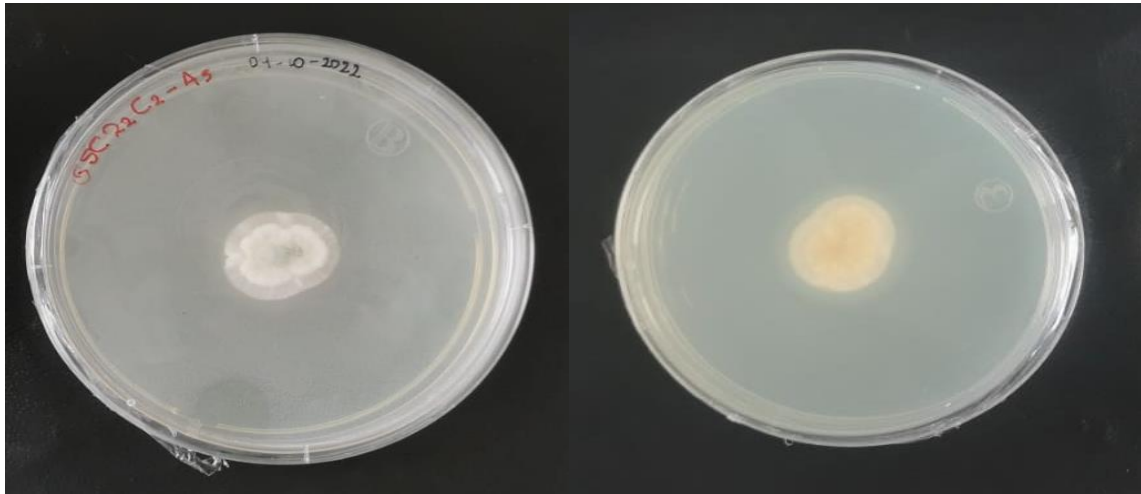


Ilustración 15-4: Anverso y reverso del aislamiento de *Metarhizium* del sistema convencional.

Realizado por: Ganan, I., 2023

- **T14:** GSOC3R2-A3 (*Metarhizium*): **Anverso:** presentó una forma circular, borde entero, elevación convexa, los anillos desde el borde hasta el centro tiene un color beige, blanco y amarillento, textura algodonosa y un diámetro de 2,5 cm a los 8 días y 3,7 cm a los 15 días. **Reverso:** color crema y amarillo con estrías en la parte central.

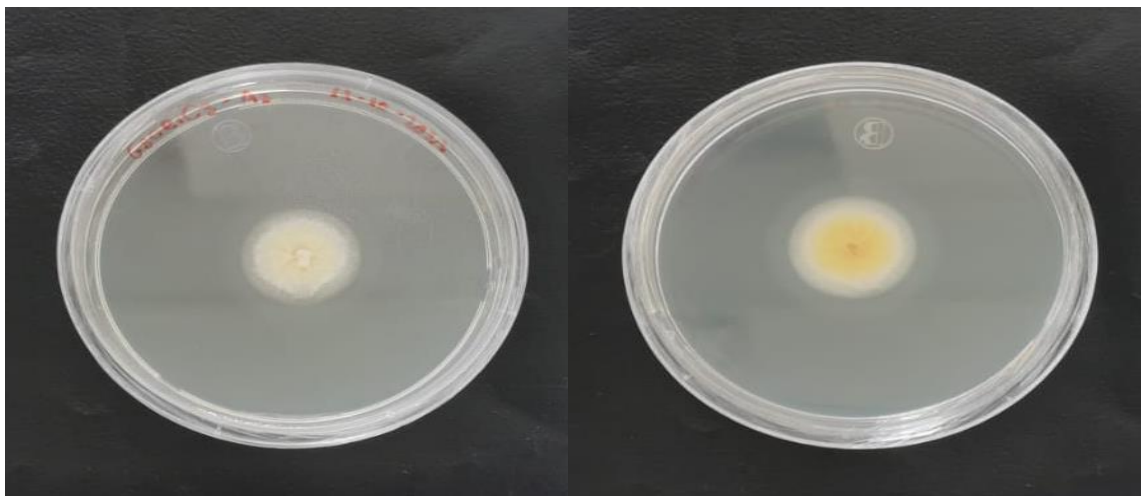


Ilustración 16-4: Anverso y reverso del aislamiento de *Metarhizium* del sistema orgánico.

Realizado por: Ganan, I., 2023

- **T16:** GSOC2R2-A1 (*Beauveria*): **Anverso:** presentó una forma circular, borde entero, elevación umbonada, color blanco, textura algodonosa con un diámetro de 1,8 cm a los 8 días y 2,7 cm a los 15 días después del aislamiento. **Reverso:** color blanco beige y sin estrías.

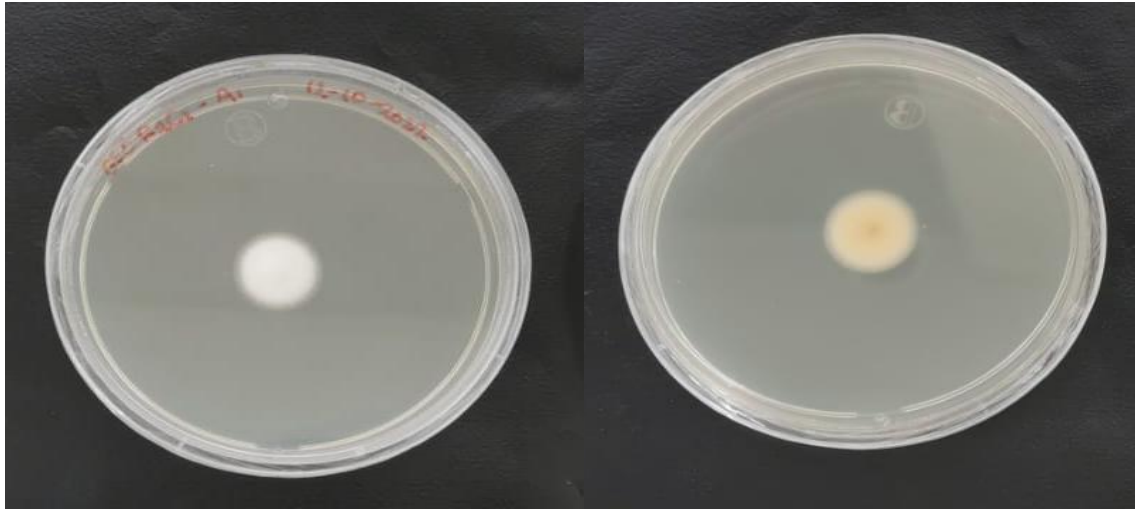


Ilustración 17-4: Anverso y reverso del aislamiento de *Beauveria* del sistema orgánico.

Realizado por: Ganan, I., 2023

4.1.5.2 Descripción microscópica

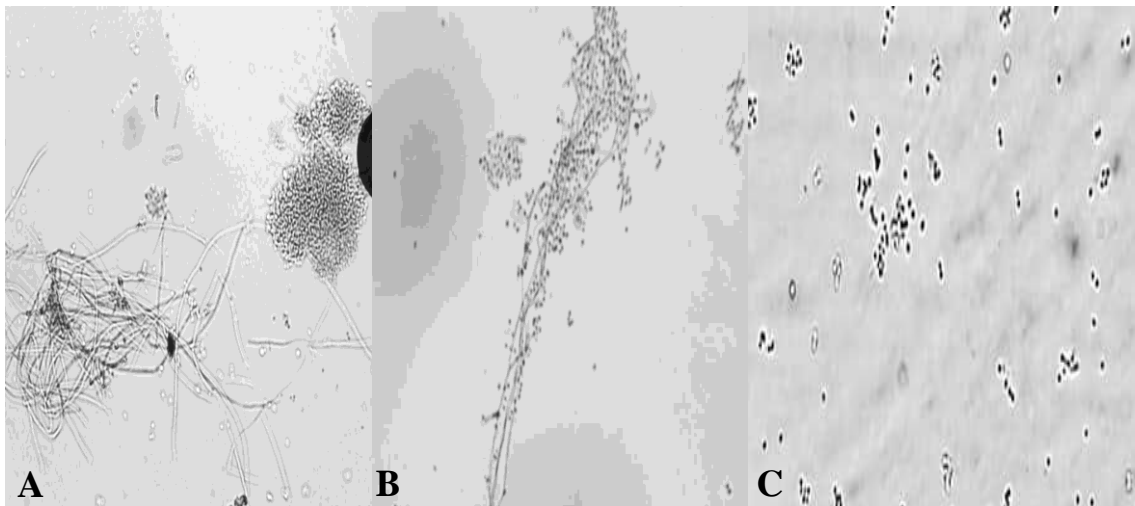


Ilustración 18-4: Estructuras microscópicas de *Beauveria*.

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 18-4 se puede apreciar las estructuras de *Beauveria* a nivel microscópico, A) hifas ramificadas y grupos de células conidiogénicas, B) células globosas en grupos densos, C) esporas globosas y esféricas.

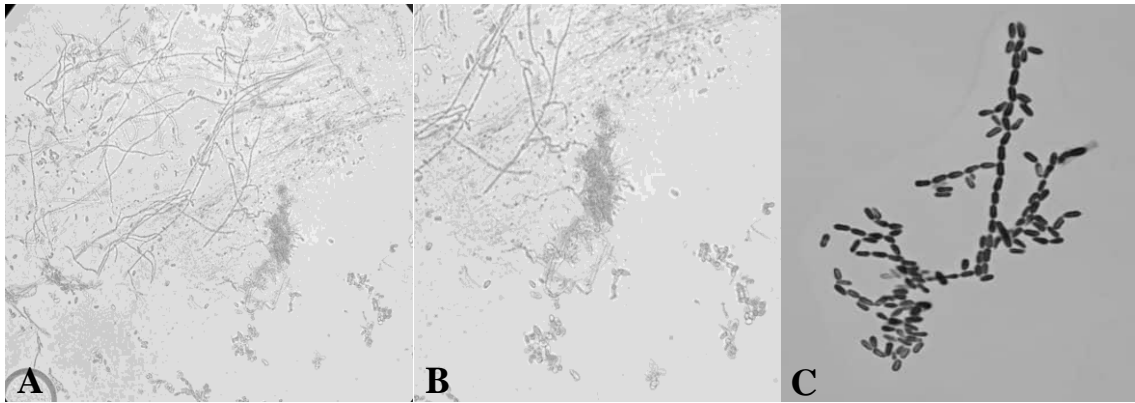


Ilustración 19-4: Estructuras microscópicas de *Metarhizium*.

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 19-4 se puede apreciar las estructuras de *Metarhizium* a nivel microscópico, A) conidióforos ramificados de diferentes longitudes, B) conjunto de conidios alargados, C) esporas cilíndricas unidas de forma lateral.

4.1.5.3 Identificación molecular

Este punto se llevó a cabo en tres partes: laboratorio de fitopatología, empresa MACROGEN KOREA y en programas de verificación.

En el laboratorio de fitopatología se obtuvo la extracción del ADN y la amplificación PCR de los aislamientos más efectivos, posteriormente eso fue enviado a la empresa MACROGEN KOREA para realizar la secuenciación genética de cada una, finalmente gracias al programa Chromas Technelysium Pty 2.6.6 el cual sirve para visualizar y editar cromatogramas para la secuenciación automatizada de ADN y en la herramienta BLAST NCBI se comparó la secuencia objeto con una base de datos con secuencias para ver con cuál de ellas tiene mayor similitud.

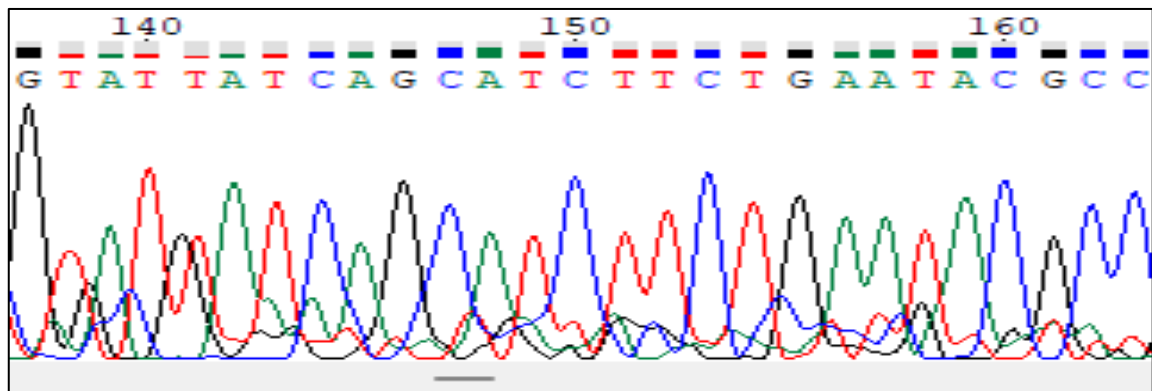


Ilustración 20-4: Secuenciación genética de *Beauveria bassiana*.

Realizado por: Ganan, I., 2023.

En la ilustración 20-4 se puede apreciar la secuenciación de ácidos nucleicos de *Beauveria bassiana* el cual presenta picos pronunciado y ruido entre ellos , sin embargo este no fue un factor limitante para determinar su especie.

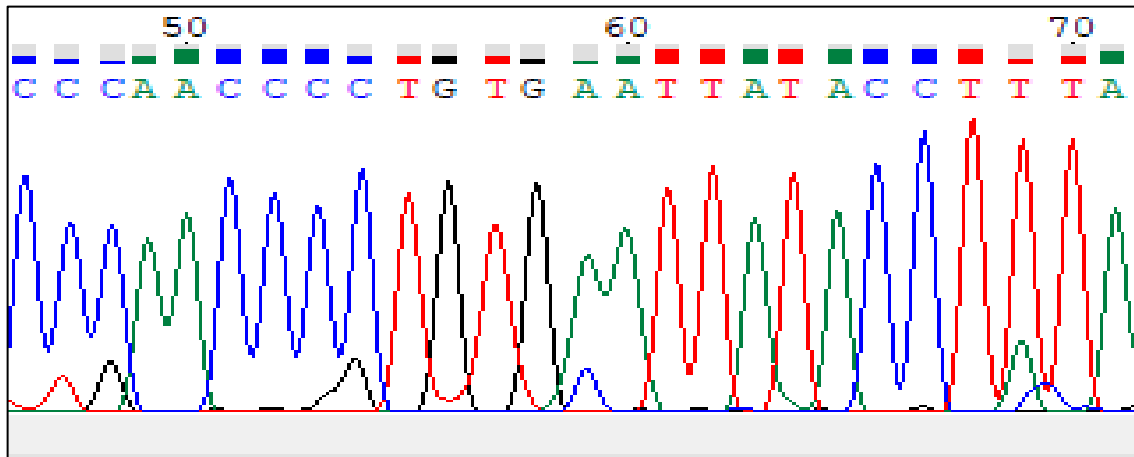


Ilustración 21-4: Secuenciación genética de *Metarhizium anisopliae*.

Realizado por: Ganan, I., 2023

En la ilustración 21-4 se puede apreciar la secuenciación de ácidos nucleicos de *Metarhizium anisopliae*, no presenta ruido, sus picos son pronunciados y las bases nitrogenadas se encuentran bien definidas.

4.2 Discusión de los resultados

4.2.1 Análisis fisicoquímicos de las muestras de suelo

Según (Fernández Salas et al., 2021 p. 139) y (Elósegui Claro et al., 2006 pp. 269-270) reportan que las poblaciones de los hongos entomopatógenos dependen de los niveles de materia orgánica, humedad, sombra, nitrógeno, fósforo y potasio, mientras que (Góngora Botero et al., 2009 p. 6) reportan que tener un pH cercano a 7 permite la germinación pronta de los conidios. Gracias a lo expuesto por (Salamanca Jiménez et al., 2005 p. 382) al presentar una textura arenosa posee densidad aparente entre 1,2 y 1,6 g/cm^3 , si supera dicho rango el suelo se compacta impidiendo el desarrollo radicular y presencia de microorganismos.

En este contexto, los resultados indican que a pesar de no haber altos porcentajes de materia orgánica en las muestras de suelo y que el nitrógeno este bajo existe la presencia de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* debido a que el rango del

pH coincide al ser neutro y la densidad aparente fluctúa entre 1,4 y 1,6 g/cm^3 logrando así que no haya compactación del suelo.

4.2.2 Número de especies entomopatógenas

Según (Salazar et al., 2007 p. 237) indican que el contenido de materia orgánica, temperatura y humedad relativa son aquellos factores que pueden llegar afectar la eficiencia y persistencia de los microorganismos entomopatógenos en el suelo. De acuerdo con (Schapovaloff et al., 2015 p. 141) mencionan que *Beauveria bassiana* no persiste mucho tiempo en el suelo en área de clima frío y generalmente *Metarhizium anisopliae* puede llegar a sobrevivir más tiempo que *B. bassiana* debido a que este último es más susceptible a la interacción con el conjunto de microorganismos del suelo que contribuyen a la agricultura sostenible.

Los resultados coinciden con lo mencionado por este autor, en la presente investigación se obtuvo 14 aislamientos de *Metarhizium* y 5 aislamientos de *Beauveria*, predominando el primer género probablemente asociado a las condiciones climáticas de San José de Guashi, además que los suelos donde se cultivan de manera agroecológica presentaron menor porcentaje de materia orgánica en comparación con los suelos donde cultivan de manera convencional.

4.2.3 Aislamientos más efectivos

Los aislamientos de mayor efectividad presentaron una alta concentración de esporas/ml a diferencia del resto (Tabla 10-4), tanto en el sistema agroecológico como convencional fueron *Beauveria* y *Metarhizium* en los cultivos de haba, col y cebolla, de acuerdo con (Góngora Botero et al., 2009 p. 6) mencionan que al tener un pH neutro la esporulación se ve beneficiada y (Huerta Ramírez et al., 2018 pp. 72-73) reportan que en un suelo desnudo las esporas de los HE son expuestas a los rayos del sol y disminuye su viabilidad.

De acuerdo con (Elósegui Claro et al., 2006 pp. 269-270) afirman que la cantidad de los nutrientes principales (N;P;K) determina la presencia de poblaciones de hongos entomopatógenos al igual que la cantidad de materia orgánica (MO), en el presente trabajo de investigación de los seis suelos muestreados, el 65,5% corresponden a hongos entomopatógenos mientras que el 34,48% a bacterias entomopatógenas; *Metarhizium* fue aislado en un 73,68% y *Beauveria* en un 26,32% de las muestras de suelo, esto se debe a que el suelo presenta bajo porcentaje de materia orgánica y un pH de 7 aproximadamente.

4.2.4 Porcentaje de mortalidad

El porcentaje de mortalidad indica que al quinto día de haber sumergido larvas de *Galleria mellonella* en suspensiones de 10^7 esporas/ml y posteriormente colocadas de manera individual en frascos salseros de plástico a temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$) durante 10 días se obtuvo una mortalidad del 100% tanto para *Metarhizium anisopliae* como para *Beauveria bassiana*.

Según (Moreno Serrano et al., 2022 p. 34) reportan que para *B. bassiana* (con 10^7) al quinto séptimo día después de la infección tuvo una mortalidad del 50%, por lo cual se considera un agente de control promisorio contra insectos plaga, además (Torres de la Cruz et al., 2014 p. 175) menciona que para *Metarhizium anisopliae* al décimo día después de la infección tuvo una tasa de mortalidad del 96,6% sobre *Galleria mellonella* con una concentración del 10^7 esporas/ml y una temperatura de 28°C , los resultados que se obtuvieron en la presente investigación son similares.

4.2.5 Dosis letal 50

La concentración letal 50 para *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* del sistema convencional fue de $3,95 \times 10^9$, $4,44 \times 10^8$ y $3,54 \times 10^7$ esporas/ml siendo sus porcentajes de mortalidad 40%, 60% y 80% y del sistema orgánico fue de $4,18 \times 10^9$, $3,09 \times 10^8$ y $1,71 \times 10^7$ esporas/ml siendo sus porcentajes de mortalidad 40%, 60% y 86,67% al tercer, quinto y séptimo día respectivamente, mientras que para *B. bassiana* en el sistema convencional fue de $7,28 \times 10^9$, $1,87 \times 10^8$ y $1,48 \times 10^7$ esporas/ml siendo su porcentaje de mortalidad de 40%, 66,67% y 86,67% y en el sistema orgánico fue de $4,18 \times 10^9$, $5,34 \times 10^8$ y $4,23 \times 10^7$ siendo su porcentaje de mortalidad de 40%, 53,33% y 80% a los mismos días.

Al evaluar la patogenicidad al séptimo día a una temperatura de 28°C con una concentración de 10^8 esporas/ml en *M. anisopliae* presentó una mortalidad del 60% en los dos sistemas y en *B. bassiana* el 53,33% para el sistema orgánico mientras que del 66,67% para el sistema convencional, dichos resultados son notables al comparar con experimentos similares ya que (Moreno Serrano et al., 2022 p. 38) reportan que el aislado de *B. bassiana* (D-Bb1400) alcanzó un tiempo medio de supervivencia de 7,31 días y una concentración letal de $1,55 \times 10^8$ esporas/ml.

4.2.6 Tiempo letal 50

El tiempo letal 50 para *M. anisopliae* sobre larvas de *G. mellonella* del sistema convencional y orgánico fue al quinto día con concentraciones de $4,44 \times 10^8$ y $3,09 \times 10^8$ esporas/ml respectivamente y para *B. bassiana* en los mismos sistemas y al mismo tiempo fue con concentraciones de $1,87 \times 10^8$ y $5,34 \times 10^8$ esporas/ml respectivamente. Estos resultados presentan cierta similitud a los reportados por (Moreno Serrano et al., 2022 p. 38) ya que con una concentración de $1,55 \times 10^8$ esporas/ml de *B. bassiana* su tiempo letal 50 fue de 7,31 días.

4.2.7 Caracterización morfológica

Las características morfológicas de los aislamientos GSCC3R2-A1 y GSOC2R2-A1 correspondientes a *B. bassiana* son similares a lo reportado por (García et al., 2011), (Pedrini, 2022 pág. 1) y (Noboa et al., 2015) ya que su diámetro es de 2 cm al cabo de 10 días con borde circular, textura algodonosa, color blanco y posteriormente amarillenta en la parte central.

Por otro lado, las características de los aislamientos GSCC2R2-A5 y GSOC3R2-A3 correspondientes a *M. anisopliae* son similares a los reportados por (García, et al., 2011) y (Vázquez, 2022) ya que presenta un borde circular con un diámetro de 2,5 cm a los días, al principio una coloración verde oliva y posteriormente verde oscuro porque las esporas maduran, textura algodonosa y superficie plana.

4.2.8 Caracterización molecular

Con la secuenciación genética de los aislamientos se pudo corroborar que, efectivamente pertenecen a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* gracias al programa Chromas Technelysium Pty 2.6.6 y a la herramienta BLAST NCBI, además sus características morfológicas son similares a lo reportado por (Pacasa Quisbert et al., 2017 pp. 9-16).

4.3 Comprobación de hipótesis

Gracias a la investigación realizada se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna porque al menos se aisló y caracterizó un microorganismo entomopatógeno de las muestras de suelo de los sistemas orgánico y convencional de producción agrícola familiar.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Los microorganismos entomopatógenos presentes en el sistema convencional corresponden a un 63,16% mientras que en el sistema orgánico fue de 36,84%. Por otra parte, en total se obtuvo 14 cepas (73,68%) de *Metarhizium anisopliae* y 5 cepas (26,32%) de *Beauveria bassiana* indicando así que el primer género es más abundante y persistente en zonas de clima frío que el segundo género.
- La concentración de 10^7 esporas/ml produjo una mortalidad del 100% al quinto día para los aislamientos GSCC2R2-A5 y GSOC3R2-A3 correspondientes a *Metarhizium anisopliae* y GSCC3R2-A1 y GSOC2R2-A1 correspondientes a *Beauveria bassiana* tanto del sistema convencional como orgánico. La DL50 y el Tiempo Letal 50 al quinto día para el aislamiento *M. anisopliae* del sistema convencional fue de $4,44 \times 10^8$ esporas/ml y para el aislamiento de *B. bassiana* fue de $1,87 \times 10^8$ esporas/ml, para el aislamiento de *M. anisopliae* del sistema orgánico fue de $3,09 \times 10^8$ esporas/ml y para el aislamiento de *B. bassiana* fue de $5,34 \times 10^8$ esporas/ml, por lo cual se concluye que el aislamiento de *B. bassiana* del sistema convencional es el más virulento.
- Los aislamientos de mayor efectividad presentaron las siguientes características morfológicas, en el caso de *Beauveria* su coloración fue blanca y luego se tornó amarillenta, de textura algodonosa y forma circular, mientras que para *Metarhizium* su coloración al inicio fue verde olivo y luego verde oscuro, textura algodonosa y forma circular. De acuerdo con el análisis molecular los aislamientos correspondieron a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

5.2 Recomendaciones

- Buscar otras asociaciones de cultivos que potencien el desarrollo de microorganismos entomopatógenos en los suelos.
- Incluir a los aislamientos más efectivos obtenidos en la elaboración de bioinsumos.

BIBLIOGRAFÍA

ALBUQUERQUE, E. & ALBUQUERQUE E. Hongos entomopatógenos: Importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae), [en línea], 2018, p. 21. [Consulta: 21 septiembre 2022]. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25735/1/Maranhao.pdf>.

ALTIMIRA, FABIOLA. Microorganismos con actividad entomopatógena. [en línea], 2020. [Consulta: 12 septiembre 2022]. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6896/NR42158.pdf?sequence=8&isAllowed=y>.

ARAÚJO, JPM Y HUGHES , DP. Chapter One - Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? *En: Lovett B, Leger RJS (eds) Advances in genetics, Elsevier, Amsterdam.* [en línea], 2016, (94). [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>.

BADII, M. H. Y ABREU, J. L. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Daena: International Journal of Good Conscience.* [en línea], 2006, 1(1), p. 82. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: [http://www.spentamexico.org/v1-n1/1\(1\)%2082-89.pdf](http://www.spentamexico.org/v1-n1/1(1)%2082-89.pdf).

BUSTAMANTE , RAFAEL. Evaluación de Beauveria bassiana en el control biológico de larvas de la polilla Oidaematophorus espeletiae. (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad de La Salle, Escuela de Ciencias Básica y Aplicadas, Bogotá – Colombia, 2019.

CAÑEDO, VDERÓNICA Y AMES, TERESA. *Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos.* Lima -Perú : s.n., 2004, p. 35-37, ISBN 92-9060-238-4.

CARBONERO, CECILIA Y CÓRDOVA, MILTON. Aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos agrícolas de ica y su efectividad in vitro en el control de *Spodoptera frugiperda* (SMITH). (Trabajo de titulación) (Biólogo).Universidad Nacional "San Luis" de ICA. Facultad de Ciencias Biológicas, 2014, p.7-8. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13028/2200/500.040.0000007.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CARRERA, MARÍA DE LOURDES. Producción de *Bacillus thuringiensis*, en Berliner a nivel de laboratorio. (Trabajo de titulación) (Doctorado).Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, 2009.

CASTILLO, FRANCISCO Y DESGARENNES, DAMARIS. Bacterias protectoras de cultivos agrícolas. [en línea], 2022. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1620-bacterias-protectoras-de-cultivos-agricolas#:~:text=Entre%20las%20bacterias%20entomopat%C3%B3genas%20se,%2C%20Br evibacillus%2C%20Paenibacillus%20y%20Lisynibacill.>

COLÍN, HORTENSIA , HERNÁNDEZ CUEVAS, ANDREA Y MONROY, RAFAEL. El manejo tradicional y agroecológico en unhuerto familiar de México, como ejemplo de sostenibilidad. [en línea], 2012, p.14. Cuernavaca, Morelos-México, 2 (10). [Consulta: 23 de Noviembre de 2022]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5294478.pdf>.

CONTRERAS, HÉCTOR., et al. Identificación morfológica y molecular de aislamientos del género *Metarhizium*, aislados de insectos plaga de la palma de aceite en Colombia. *Tecnología e innovación por una palmicultura colombiana resiliente*. [en línea] 2020. [Consulta: 27 septiembre 2022]. Disponible en: https://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Cenipalma/Reunion-tecnica-2020/33_Morfolog%C3%ADa%20de%20aislamientos%20de%20Metarhizium%20aislados%20de%20insectos%20plaga%20en%20palma.pdf.

CORDERO MONTES, JAIME EDUARDO. Determinantes de la producción destinada al mercado en la agricultura familiar peruana. (Trabajo de titulación) (licenciatura). Pontificia Universidad Católica del Perú, 2022, p.9. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/22634/CORDERO_MONTES_JAIME_EDUARDO_DETERMINANTES_PRODUCION.pdf?sequence=1&isAllowed=y

DARA, SURENDRA. Entomopathogenic microorganisms: modes of action and role in IPM. *E-JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND BIOLOGICALS*. UCANR electronic extension journal previously published as "Strawberries and Vegetables" [en línea], 2017. [Consulta: 14 marzo 2023.]

ELÓSEGUI CLARO, ORESTES, JIMÉNEZ RAMOS , JESÚS Y CARR PÉREZ, AIDANET. Aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitosporicos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Fitosanidad.* [en línea], 2006, 4 (10), p.269-270. [Consulta: 20 marzo 2023.] <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116183003.pdf>.

EVANS, HARRY. Uso actual y potencial de los hongos entomopatógenos para el control biológico de artrópodos plagas. Bogotá – Colombia. *Revista Palmas.* [en línea], 1993, 1(14), p. 45. [Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/368/368>.

FAO. Control de plagas de insectos. Joint FAO/IAEA Organización Internacionadl de Energía Atómica. *iaea.org.* [en línea], 2022. [Consulta: 21 septiembre 2022.] <https://www.iaea.org/es/temas/control-biologico#:~:text=El%20control%20biol%C3%B3gico%20supone%20la,respetuosa%20con%20el%20medio%20ambiente>.

FAO. Hacia una agricultura familiar mas fuerte. Organización de las Naciones Unidad par la Alimentación y la Agricultura. [en línea], 2014, p. 8. [Consulta: 30 agosto 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i4171s/i4171s.pdf>.

FAO. Reseña de Agricultura Familiar-Ecuador. *ondarural.org.* [en línea], 2022. [Consulta: 13 septiembre 2022], Disponible en: <https://ondarural.org/sites/default/files/2022-04/Rese%C3%B1a%20Agricultura%20Familiar-Ecuador.pdf>.

FAO Y SAG. Huerto Familiar Integrado. [en línea], 2015, p. 7-8. [Consulta: 23 noviembre 2022] <https://www.fao.org/3/at761s/at761s.pdf>.

FERNÁNDEZ SALAS, AGUSTÍN Y ALONSO DÍAZ, MIGUEL ÁNGEL. Efecto de la sombra de árboles sobre la presencia y diversidad de hongos entomopatógenos en suelos de unidades de producción bovina tropicales. *Avances en investigación agropecuaria (Sept)* [en línea], 2021, p. 139. Consulta: 30 agosto 2022]. Disponible en: http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2021/sept/reunion/art_10.pdf

FUNDACIÓN ESQUEL. Agricultura Familiar y Campesina (AFC) [en línea], 2020. [Consulta: 12 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.esquel.org.ec/es/que-son-las-mesas-tematicas->

del-pacto/agricola-

campesina.html#:~:text=El%2070%20%25%20de%20los%20alimentos,de%201%20a%2020%20hect%C3%A1reas..

GALÁN, LUCILA. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos de las diferentes zonas citrícolas de México. (Trabajo de titulación) (Doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 2012, p. 22. [Consulta: 10 febrero 2023]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2799/1/1080227487.pdf>

GAMA, LILIA Y CONTRERAS SÁNCHEZ, WILFRIDO MIGUEL. Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. *Revista de Divulgación: División Académica de Ciencias Biológicas*. [en línea], 2008, p. 25. [Consulta: 4 febrero 2023]. Disponible en: <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/846/709>.

GARCÍA, MANUEL, et al. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario* [en línea], 2011. [Consulta: 8 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4578/457845138002.pdf>. ISSN: 1665-3262.

GÓMEZ, HILDA, et al. *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. Lima - Perú : s.n., 2014. [Consulta: 15 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producci%C3%83%C2%B3n-y-Uso-de-Hongos-Entomopat%C3%83%C2%B3genos.pdf>

GÓNGORA BOTERO, CARMENZA E, MARÍN MARÍN, PATRICIA Y BENAVIDES MACHADO, PABLO. Claves para el éxito del hongo *Beauveria* Claves para el éxito del hongo *Beauveria* Claves para el éxito del hongo *Beauveria*. *Programa de Investigación Científica* [en línea], 2009, p. 6. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://biblioteca.cenicafe.org/jspui/bitstream/10778/346/1/avt0384.pdf>.

GONZÁLEZ, GLADYS et al. Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglè [en línea], 2021. [Consulta: 22 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.lamjol.info/index.php/CALERA/article/download/11555/13393/42658>.

GRIJALBA, ERIKA et al. Bacteria Entomopatógenas en el Control Biológico de Insectos. *repository.agrosavia.co*. [en línea], 2019. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/34070>.

HUERTA RAMÍREZ, ALEJANDRO et al. Presence of native entomopathogenic fungi in soils cultivated with corn from Epitacio Huerta municipality, Michoacán. *Bioteología y Sustentabilidad. Michoacán-México* [en línea], 2018, p. 72-73. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/826/1/498-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1675-1-10-20190219.pdf>.

HUERTAS COMUNITARIAS Y PROMOTORES DEL PARQUE NACIONAL COFRE DE PEROTE. Guía de Huertos Agroecológicos [en línea], 2021, p.4-5. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://img1.wsimg.com/blobby/go/67a52e14-bc17-4b5a-bafa-c913222597a0/downloads/Gu%C3%ADa%20de%20huertos%20agroecol%C3%B3gicos%20-%20Final.pdf?ver=1643133599417#:~:text=La%20importancia%20de%20un%20huerto,%2C%20tallos%2C%20hojas%20y%20frutos..>

IBARRA, ALBA MARY Y VARELA , AMANDA. Aislamiento. identificación y caracterización de hongos como agentes potenciales de control biológico en algunas regiones colombianas. *Revista Colombiana De Entomología* [en línea], 2002, 2(28), p. 130. [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: <http://doi.org/10.25100/socolen.v28i2.9637> .

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA. Los beneficios de tener una huerta agroecológica. *inta.gob.ar* [en línea], 2015. [Consulta: 23 noviembre 2022]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/noticias/los-beneficios-de-tener-una-huerta-agroecologica#:~:text=Uno%20de%20los%20beneficios%20de,a%20partir%20de%20residuos%20org%C3%A1nicos.>

INTAGRI. Los Entomopatógenos, control biológico de plagas. *Intagri*. [en línea], 2021. [Consulta: 12 septiembre 2022.]. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/los-entomopatogenos-control-biologico-de-plagas>.

JIMÉNEZ GARCÍA, ANA DELIA. Bacterias entomopatógenas como alternativa para el biocontrol de plagas [en línea], 2019, San Cristobal de la laguna - España. [Consulta: 16 febrero 2023]. Disponible en:

<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/15760/Bacterias%20entomopatogenas%20como%20alternativa%20para%20el%20biocontrol%20de%20plagas.pdf?sequence=1>.

LEÓN PAREDES, JOFFRE. Evaluar el comportamiento agronómico de dos cultivares de lechuga (*Lactuca sativa* L.), sembradas mediante sistema hidropónico utilizando varias dosis de Biol en el cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura [en línea], 2015. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/277/T-UTB-FACIAG-AGR-000066.02.pdf?sequence=8&isAllowed=y#:~:text=La%20provincia%20que%20tiene%20la,una%20producci%C3%B3n%20de%20548%20Tm..>

LITWIN, ANNA , NOWAK, MONIKA Y RO'ZALSKA, SYLWIA. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Rev Environ Sci Biotechnol. Springer* [en línea], 2020. [Consulta: 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11157-020-09525-1.pdf>.

LÓPEZ, JOSÉ ANTONIO et al. *Control biológico de plagas agrícolas*. Managua-Nicaragua: CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2004 p. 16.

LOVETT, BRIAN Y LEGER, RAYMOND. Los patógenos de insectos. Espectro de Microbiol. *Revistas ASM. Espectro de Microbiología*. [en línea], 2017. 2(5). [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016>.

LOZANO, MÓNICA. Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolii* Bemis & Perring en cultivo de Algodón *Gossypium hirsutum* L. *Eprints*. [en línea], 2007. [Consulta: 10 noviembre 2022]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/1794/1/1020160688.PDF>.

MALETTA, HÉCTOR. *La pequeña agricultura en el Perú: una tipología microrregionalizada*-Lima: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Lima-Perú: FAO, 2017. ISBN: 978-92-5-309613-8. [Consulta: 18 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i6759es/i6759es.pdf>

MAMANI DE MARCHESE, A. Y FILIPPONE, M.P. Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista agronómica del noroeste argentino. Revista agronómica noroeste argentina*. [en línea], 2018, 1(38), p. 13-14. [Consulta: 22 diciembre 2022]. Disponible

en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S2314-369X2018000100001&script=sci_arttext&tlng=es.

MAROTO, STEVEN A. Agricultura familiar. Un nuevo sentido hacia el desarrollo y la seguridad alimentaria [en línea], 2016. [Consulta: 20 septiembre 2022]. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2599/BVE17028576e.pdf;jsessionid=7665808BE8705209BAB3E36194F40CF3?sequence=1>.

MARQUINA BAZÁN, ROBERT AND CARBAJAL, AÍDA. *Efecto de la temperatura en el ciclo de desarrollo de Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae)*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, [en línea], 2017 (Perú), 37(2), ISSN: 2313-31711. [Consulta: 4 noviembre 2022]. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/download/2133/2028/6327>

MARTÍNEZ VALLE, LUCIANO. La Agricultura familia en el Ecuador. FIDA-RIMISP [en línea], 2013, p. 7. [Consulta: 16 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.rimisp.org/wp-content/files_mf/1434745799147AgriculturaFamiliarEcuadorMartinez_editado.pdf.

McFARLAND, JOSEPH. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines [en línea], 1907. [Consulta: 15 febrero 2023]. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/444820>.

McGuire, AMY AND NORTHFIELD, TOBIN. Tropical Occurrence and Agricultural Importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* [en línea], 2020, 4. [Consulta: 8 noviembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>. SSN=2571-581X.

MEYLING, NICOLAI. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment, Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Thorvaldsensvej 40, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark [en línea], 2007, 5 (1). [Consulta: 8 noviembre 2022]. Disponible en: <https://orprints.org/id/eprint/11200/1/11200.pdf>

MINAGRI. Estrategia nacional de agricultura familiar 2015-2021 [en línea], 2015. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.agrorural.gob.pe/wp-content/uploads/2016/02/enaf.pdf>.

MORENO MIRANDA, CARLOS et al. El sector hortifrutícola de Ecuador: Principales características socio-productivas de la red Agroalimentaria de la uvilla (*Physalis peruviana*). *Ciencia y Agricultura* [en línea], 2019, 1 (16). [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/5600/560059292003/html/>.

MORENO SERRANO, DUSTIN et al. Pathogenicity of native isolates (*Beauveria bassiana*) and (*Cordyceps javanica*) on larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista Investigaciones Agropecuarias*, [en línea], 2022 (Panamá), 2(4), ISSN-E: 2644-3856. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <http://portal.amelica.org/amei/journal/222/2223233003/2223233003.pdf>.

MONZÓN, ARNULFO Y GUHARAY, FALGUNI. Producción y uso de hongos entomopatógenos. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza* [en línea], 2021 (Nicaragua), p. 37. [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10698/A0949e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

NOBOA, GISELA Y QUELAL, ALEX. *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productores de café orgánico de la Asociación RÍO INTAG, Cantón Cotacachi.* (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, [en línea], 2015. Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>

OLIVEIRA DA SILVA, ANGÉLICA et al. Preservação de linhagens de *Bacillus thuringiensis* por ultracongelamento e incorporação ao acervo da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo [en línea], 2017. [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163119/1/Preservacao-linhagens.pdf>.

ORTÍZ, JOSÉ. *Aislamiento y caracterización de hongos entomopatógenos presentes en el suelo de las diferentes zonas agrícolas de la Provincia de Tungurahua.* (Trabajo de titulación) (Ingeniería). Universidad Técnica de Ambato [en línea], 2021. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33664/1/BQ%20285.pdf>

PACASA QUISBERT , FERNANDO et al. Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K'iphak'iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society* [en línea], 2017, 1(8), ISSN 2072-9294. [Consulta: 25 marzo 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a02.pdf.

PACHECO, MARÍA, RESÉNDIZ, FRANCISCO AND ARRIOLA, VICTOR. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista mexicana de ciencias forestales* [en línea], 2019 (México), ISBN 2007-1132, 56(10), ISSN 2007-1132. [Consulta: 12 septiembre 2022]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322019000600004. ISSN.

PDOT. Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Santiago de Calpi [en línea], 2015. [Consulta: 21 septiembre 2022.]. Disponible en: https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0660821800001_Diagnostico%20calpi_15-05-2015_12-50-35.pdf

PEDRINI, NICOLÁS. The Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Shows Its Toxic Side within Insects: Expression of Genes Encoding Secondary Metabolites during Pathogenesis : s.n., 2022, (Argentina), 8(5). [Consulta: 21 septiembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/jof8050488>

Plan Estratégico de Desarrollo Cantonal. 2019. Plan de desarrollo cantonal. Alcandía de Riobamba [en línea], 2019, p. 24. [Consulta: 25 octubre 2022.]. Disponible en: <https://www.epemapar.gob.ec/wp-content/uploads/2017/03/plandesarrollocantonal.pdf>.

QUINTANA, JUAN. Extractos naturales sobre la mortalidad de la polilla grande de la cera (*Galleria mellonella*) [en línea], 2017 (México). [Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en: http://www.itzonamaya.edu.mx/web_biblio/archivos/res_prof/agro/agro-2017-5.pdf.

RAMÍREZ, ARGELIA et al. Diversity of entomopathogens in agricultural soil of three production systems in Tepatepec Hidalgo, State [en línea], 2019, (México), ISSN: 2448-475X. [Consulta: 4 octubre 2022]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/340476612>

RESTREPO GARCÍA et al. Efecto de diferentes fuentes de miel en la cría de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) para la multiplicación de nematodos entomopatógenos.

Scielo. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural, [en línea], 2019, 1(23), ISSN 0123-3068, p. 74. [Consulta: 9 noviembre 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v23n1/0123-3068-bccm-23-01-00073.pdf>. ISSN.

ROCHA, PEDRO. Exponen los beneficios del uso de bioinsumos en el agro en Venezuela. *IICA.int*. [en línea], 2020. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: <https://iica.int/es/prensa/noticias/exponen-los-beneficios-del-uso-de-bioinsumos-en-el-agro-en-venezuela#:~:text=Los%20bioinsumos%2C%20explic%C3%B3%20Rocha%2C%20son,las%20caracter%C3%ADsticas%20biol%C3%B3gicas%20del%20suelo..>

SALAMANCA JIMÉNEZ, ALVEIRO Y SADEGHIAN KHALAJABADI, SIAVOSH. La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelos de la zona cafetera colombiana. [en línea], 2005, 56(4), p. 382. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc056%2804%29381-397.pdf>.

SALAZAR P, ANA MARÍA et al, Displacement of *Conidia* of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in Columns of Three Soil Series [en línea], 2007 (Chile), 3(67) ISSN 0365-2807, 3(67). Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072007000300002

SALCEDO, SALAMÓN Y GUZMÁN, LYA. Agricultura familiar en América Latina y el Caribe. *fao.org*, [en línea] 2014. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i3788s/i3788s.pdf>.

SANDÓN ADRIANA. Hongos entomopatógenos, su clasificación, generalidades y utilidad. *Slideshare* [en línea], 2016. [Consulta: 8 noviembre 2022], Disponible en: <https://es.slideshare.net/adrianasandon/ya-libro-hongos-entomopatogenos>.

SAUKA, DIEGO Y BENINTENDE, GRACIELA. Bacterias Entomopatógenas. [En línea], 2021, ISBN 978-987-8333-43-4. [Consulta: 13 septiembre 2022]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/142534/CONICET_Digital_Nro.921774fb-5d6b-42ed-9ed2-7bde88cc0a5f_B.pdf?sequence=5&isAllowed=y. ISSN: 0325-7541.

SCHAPOVALOFF, MARÍA E. et al. Natural occurrence of entomopathogenic fungi in soils cultivated with Paraguay tea (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) in Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. Argentina. s.n., 2015, (47), p. 14.

TANNFELD, JUAN RUBÉN. La huerta agroecológica de autosustento. *Centro Regional Chaco Formosa. Estacion Experimental Agropecuario Sáenz Peña*. [En línea], 2011, p. 8. [Consulta: 23 noviembre 2022]. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_la_huerta_agroecologica_de_autosustento_tannfeld.pdf.

TÉLLEZ, J., et al. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos [en línea], 2009, (30), p. 75-77, ISSN 0187-3180. [Consulta: 9 noviembre 2022]. Disponible en: https://www.intagri.com/public_files/Beauveria.pdf.

TORRES DE LA CRUZ, MAGDIEL, et al. Monosporic strains of *Metarhizium anisopliae* and its pathogenicity to *Galleria mellonella* in Tabasco, Mexico. *SCIELO: Revista mexicana de ciencias pecuarias* [en línea], 2014, p. 175, 2(5), ISSN 2007-1124. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242014000200004.

VALENCIA ILBAY, LIZETH LORENA. *Propuesta de estrategias de revitalización del patrimonio cultural inmaterial de la comunidad San Jose de Gaushi*. (Trabajo de titulación) (ingeniería). Universidad Estatal Amazónica. Departamento Ciencias de la Vida. Ingeniería en Turismo, Puyo-Ecuador, 2018, p. 23. Disponible en: <https://repositorio.uea.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/390/T.TUR.B.UEA.4122.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VÁZQUEZ, JOSÉ. *Metarhizium anisopliae*. *Lifeder* [en línea], 2022. [Consulta: 8 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/metarhizium-anisopliae/>.

VENEGAS, CARLOS, GÓMEZ, BÁRBARA Y INFANTE, AGUSTÍN. *Manual de transición agroecológica para la agricultura familiar campesina*. Chile : Unidad de Sustentabilidad Ambiental, INDAP, 2018, p. 12.

VIERA ARROYO, WILLIAN FERNANDO et al. Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *J. Selva Andina*

Biosph. [en línea], 2020, 2(8), p 129, ISSN 2308-3859. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2308-38592020000200006&script=sci_arttext.

YENTZEN GROUP. El control de insectos con *Bacillus thuringiensis*. [En línea], 2018.
[Consulta: 17 marzo 2023]. Disponible en:
<https://www.portalfruticola.com/noticias/2018/05/11/el-control-de-insectos-con-bacillus-thuringiensis/>.

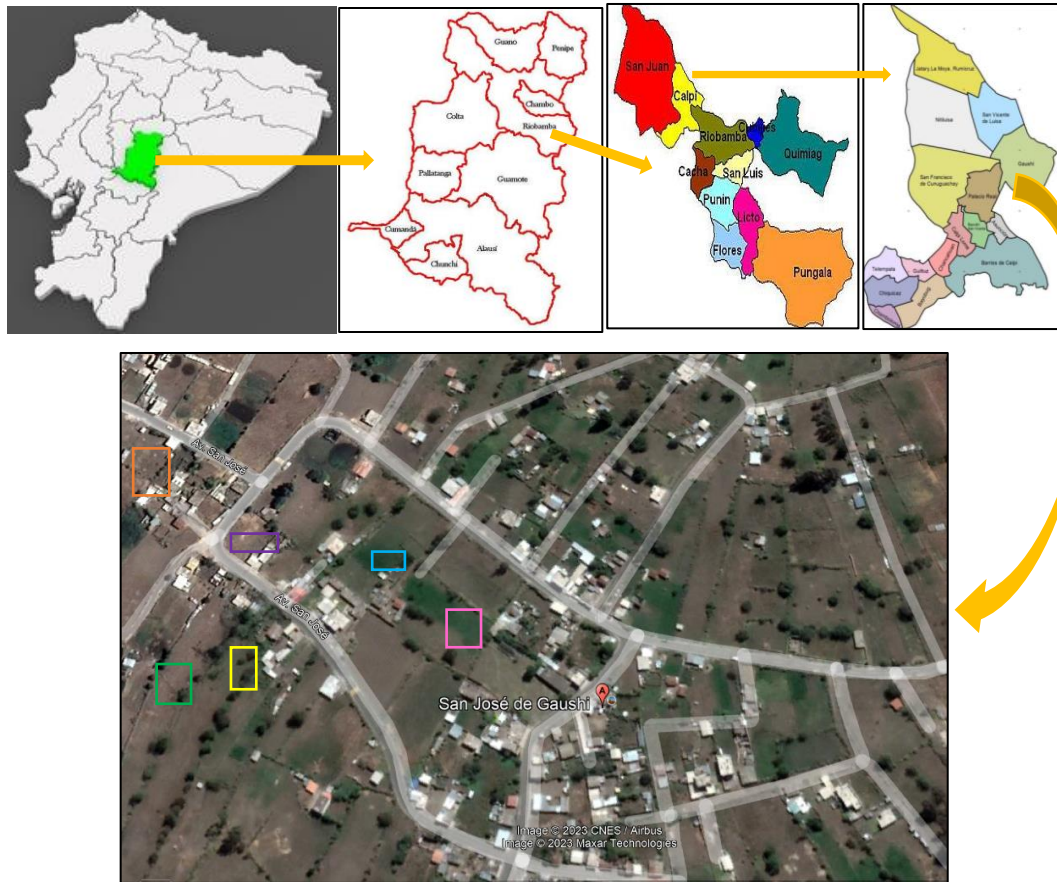


Ing. César San Castillo



ANEXOS

ANEXO A: UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL SITIO EXPERIMENTAL.



ANEXO B: TOMA DE MUESTRAS DE SUELO ORGÁNICO Y CONVENCIONAL.



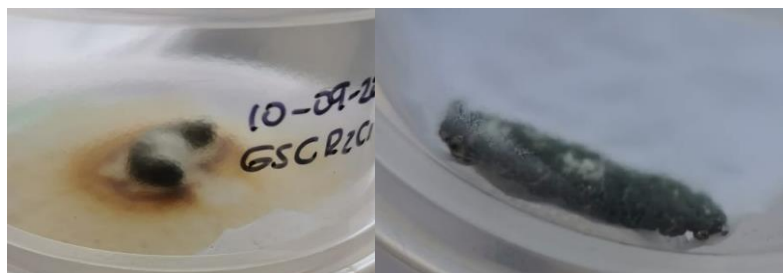
ANEXO C: CRIANZA Y ALIMENTACIÓN DE *G. mellonella*.



ANEXO D: COLOCACIÓN Y RECUPERACIÓN DE LARVAS DE *G. mellonella* A LOS 10 DÍAS.



ANEXO E: PRESENCIA DE MICELIO EN CADÁVERES DE *G. mellonella*.



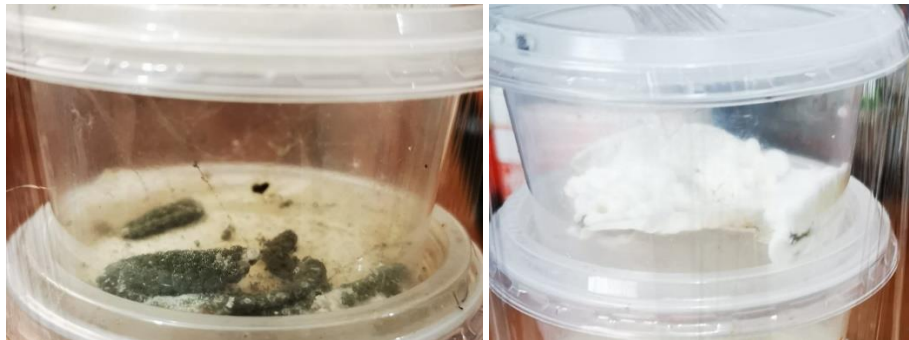
ANEXO F: AISLAMIENTO DE HONGOS Y BACTERIAS



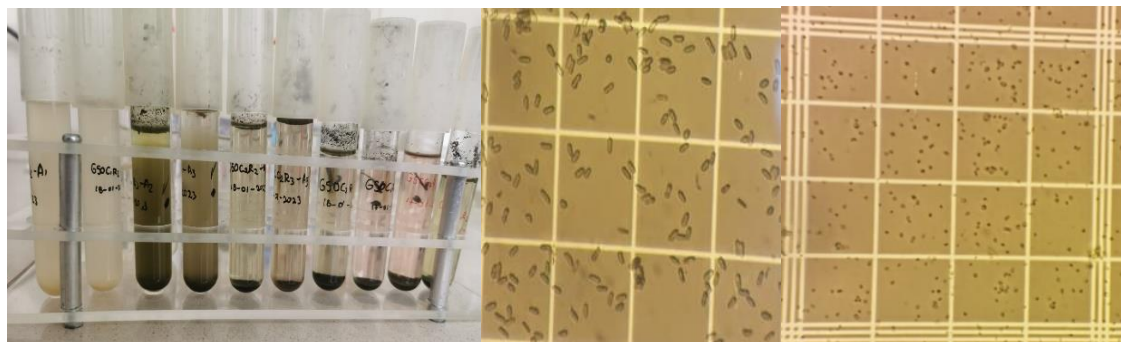
ANEXO G: SUSPENSIONES DE 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 ESPORAS/ML



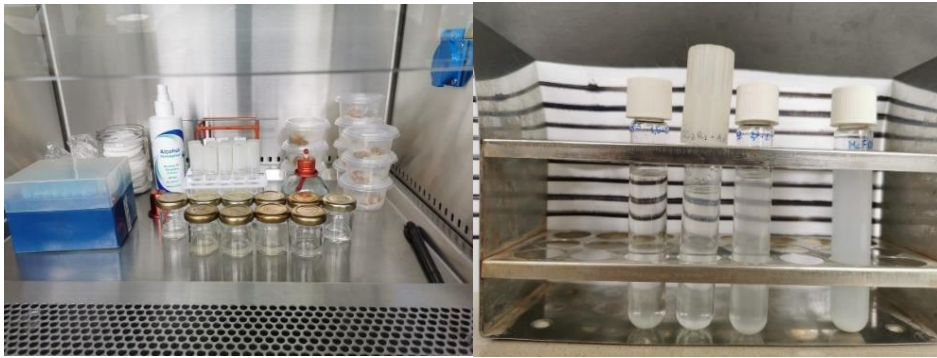
ANEXO H: LARVAS DE *G. mellonella* INFECTADAS CON *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.



ANEXO I: CONTEO DE ESPORAS/ML DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.



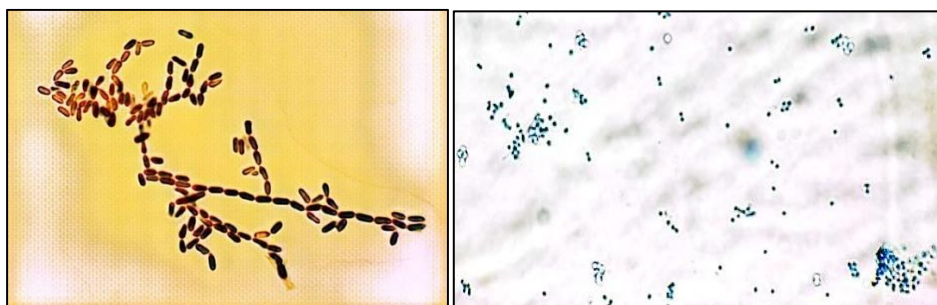
ANEXO J: CONTEO DE BACTERIAS/ML CON LA ESCALA MCFARLAND



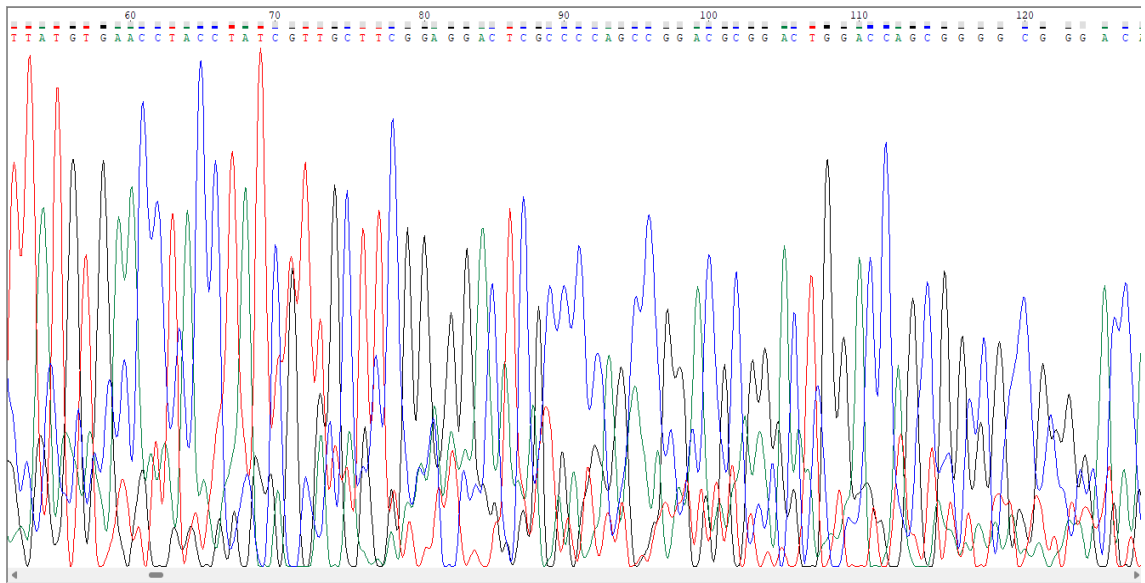
ANEXO K: CEPAS PURAS DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana*.



ANEXO L: ESTRUCTURAS DE *M. anisopliae* Y *B. bassiana* AL MICROSCOPIO.



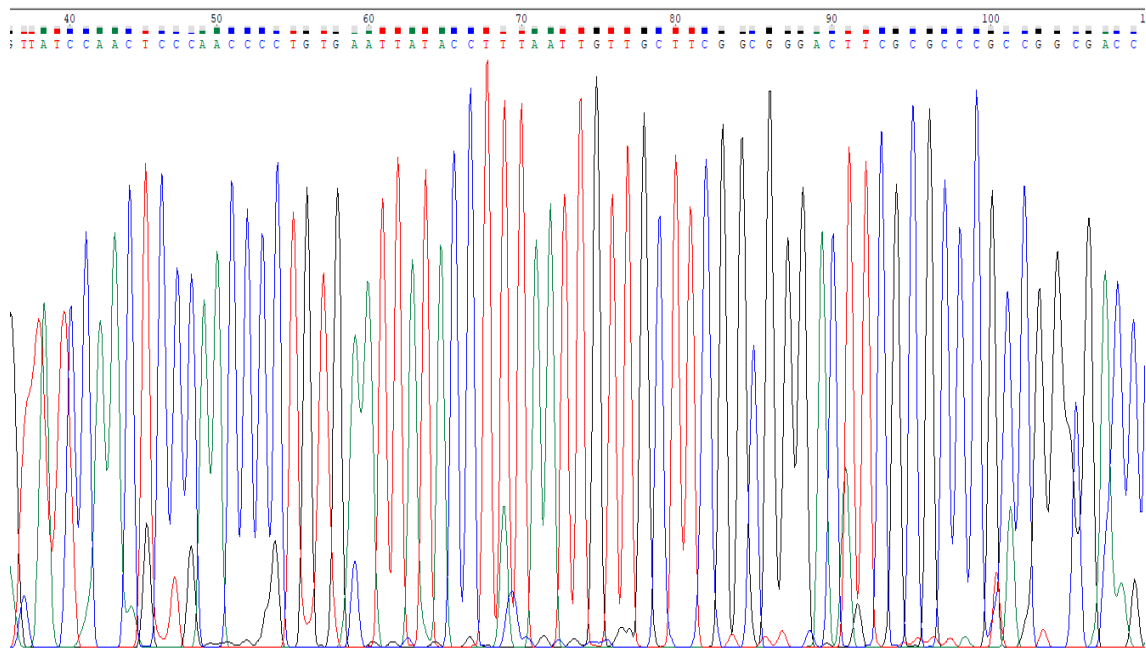
ANEXO M: SECUENCIA GENÉTICA DE *Beauveria bassiana*



ANEXO N: NCBI BLAST PARA LA SECUENCIACION GENETICA DE *Beauveria bassiana*

	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input type="checkbox"/>	Beauveria pseudobassiana aislado Pa-7 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de AR...	Beauveria pseu...	364	364	100%	3e-96	94,92%	579	MK544083.1
<input checked="" type="checkbox"/>	cultivo de Beauveria bassiana CBS: 125.36 cepa CBS 125.36 espaciador interno transcrito 1 .secuenci...	Beauveria bassi...	364	364	100%	3e-96	94,92%	541	MH855731.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria sp. 2 DLW-2022 cepa BEA02 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de ARN...	Beauveria sp. 2...	364	364	100%	3e-96	94,92%	491	OP787863.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria pseudobassiana cepa KY11211 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de A...	Beauveria pseu...	364	364	100%	3e-96	94,92%	564	ON479325.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria pseudobassiana cepa KY11111 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de A...	Beauveria pseu...	364	364	100%	3e-96	94,92%	566	ON479322.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria pseudobassiana cepa KY11101 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de A...	Beauveria pseu...	364	364	100%	3e-96	94,92%	563	ON479320.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria pseudobassiana cepa KY11071 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de A...	Beauveria pseu...	364	364	100%	3e-96	94,92%	564	ON479319.1
<input type="checkbox"/>	Clon de hongo no cultivado L049675A01 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de AR...	hongo no cultiva...	364	364	100%	3e-96	94,92%	527	JX135686.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria sp. aislado P14-10-4 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial; gen de ARN ribosom...	Beauveria sp.	364	364	100%	3e-96	94,92%	541	MW765005.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria sp. aislar el gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña LTB08 .secuencia parcial; esp...	Beauveria sp.	361	361	100%	4e-95	94,51%	539	MK884882.1
<input type="checkbox"/>	Beauveria sp. aislar el gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña LTB12 .secuencia parcial; es...	Beauveria sp.	361	361	100%	4e-95	94,51%	554	MK884878.1

ANEXO O: SECUENCIA GENÉTICA DE *Metarhizium anisopliae*



ANEXO P: NCBI BLAST PARA LA SECUENCIACION GENÉTICA DE *Metarhizium anisopliae*

	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium anisopliae cepa IWST-Ma1 18S gen de ARN ribosomal .secuencia parcial	Metarhizium ani...	394	394	60%	1e-104	89,02%	534	JN127776.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium sp. cepa W25 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribosomal 5...	Metarhizium sp.	392	392	62%	4e-104	88,39%	539	OP497889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium sp. cepa E1024 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espacia...	Metarhizium sp.	390	390	62%	1e-103	88,32%	572	MF681608.1
<input checked="" type="checkbox"/>	La secuencia de ADN genómico de Metarhizium anisopliae contiene ITS1 .gen 5.8S rRNA. ITS2. aislad...	Metarhizium ani...	390	390	62%	1e-103	88,32%	586	LT604481.1
<input checked="" type="checkbox"/>	clon de hongo no cultivado 107A70683 gen de ARN ribosomal 18S .secuencia parcial. espaciador inter...	hongo no cultiv...	390	390	62%	1e-103	88,32%	412	JX336674.1
<input checked="" type="checkbox"/>	clon de hongo no cultivado 107A61596 gen de ARN ribosomal 18S .secuencia parcial. espaciador inter...	hongo no cultiv...	390	390	62%	1e-103	88,32%	412	JX327807.1
<input checked="" type="checkbox"/>	clon de hongo no cultivado 106A55924 gen de ARN ribosomal 18S .secuencia parcial. espaciador inter...	hongo no cultiv...	390	390	62%	1e-103	88,32%	438	JX322271.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii cepa 6EIKEN gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña .secuencia parcial. ...	Metarhizium ro...	388	388	62%	5e-103	88,32%	590	MT378171.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium brunneum cepa 3GREY espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN rib...	Metarhizium br...	388	388	62%	5e-103	88,32%	548	MT374162.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium brunneum cepa 3GLEN gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña .secuencia parcial. ...	Metarhizium br...	388	388	62%	5e-103	88,32%	549	MT372486.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium brunneum cepa 8HEID ITS gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña .secuencia pa...	Metarhizium br...	388	388	62%	5e-103	88,32%	590	MT362047.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metarhizium robertsii cepa ARC12 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. es...	Metarhizium ro...	388	388	62%	5e-103	88,32%	583	MT355666.1



**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 29 / 06 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Ibeth Mishelle Ganan Quispe
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Agronomía
Título a optar: Ingeniera Agrónoma
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1102-DBRA-UTP-2023