



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

BIOPROSPECCIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS EN *Gonipterus* sp.
PRESENTES EN PLANTACIONES FORESTALES DEL GÉNERO
***Eucalyptus* DE LA EMPRESA NOVOPAN DEL ECUADOR**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA:

CLAIRE JAZMÍN ROMERO JARAMILLO

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

BIOPROSPECCIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS EN *Gonipterus* sp.
PRESENTES EN PLANTACIONES FORESTALES DEL GÉNERO
***Eucalyptus* DE LA EMPRESA NOVOPAN DEL ECUADOR**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA: CLAIRE JAZMÍN ROMERO JARAMILLO

DIRECTOR: Ing. CARLOS FRANCISCO CARPIO COBA, MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

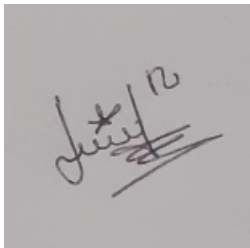
© 2022, Claire Jazmín Romero Jaramillo

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

Yo, Claire Jazmín Romero Jaramillo, declaro que el presente Trabajo 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, 25 de julio del 2023.

A square box containing a handwritten signature in black ink. The signature is cursive and includes the date '25/7/23' written above the main name.

Claire Jazmín Romero Jaramillo
215025105-2

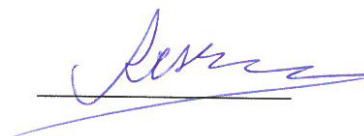
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERA FORESTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **BIOPROSPECCIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS EN *Gonipterus* sp. PRESENTES EN PLANTACIONES FORESTALES DEL GÉNERO *Eucalyptus* DE LA EMPRESA NOVOPAN DEL ECUADOR**, realizado por la señorita: **CLAIRE JAZMÍN ROMERO JARAMILLO**, 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

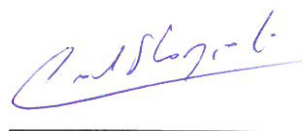
FECHA

Ing. Rosa del Pilar Castro Gómez, Ph. D.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



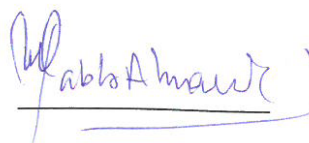
2023-07-25

Ing. Carlos Francisco Carpio Coba, MSc.
DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-07-25

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero, Ph. D.
ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-07-25

DEDICATORIA

Quiero dedicar con mucho cariño y amor este Trabajo de Integración Curricular a mi padre Antoliano Romero y a mi madre Aracely Jaramillo, por ser siempre mis pilares tanto de consuelo como de motivación, por haber sido incondicionales en esta etapa de mi vida llamada “Universidad”, por apoyarme, por confiar en mí y en mis capacidades de llegar a ser una profesional y sobre todo por nunca soltar mi mano. A mis hermanos: Benjamín, Arleen y Harol, ya que como hermana mayor espero ser un gran ejemplo a seguir para ellos. Y finalmente a mis abuelitos: Ángel Jaramillo e Ignacio Romero, quienes ya no están con nosotros en este mundo terrenal, pero con todo mi corazón anhelo que donde se encuentren puedan sentirse felices y orgullosos de mí.

Claire

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecerle a Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida siendo ya una profesional y por concederme vivir esta gran trayectoria académica llena de muchísimas experiencias. Nuevamente a mis padres por brindarme su apoyo, formar a una mujer de bien y llena de valores, y al resto de mi familia por las palabras de aliento, ánimo y motivación. A la prestigiosa y honorable Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, especialmente a la Facultad de Recursos Naturales, Carrera Ingeniería Forestal donde tuve la oportunidad de conocer a mis amig@s y a mis docentes con quienes construí un enorme lazo e hicieron el camino más divertido y reconfortante, son a quienes considero una gran familia extra. A los docentes forestales: Ing. Eduardo Salazar por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte del convenio con la empresa Novopan del Ecuador S.A., e Ing. Carlos Carpio por dirigirme y guiarme de manera responsable como director en este TIC. A los docentes de agronomía: Ph. D. Pablo Álvarez por acogerme y brindarme la oportunidad de formar parte del laboratorio de Fitopatología, por su apoyo como asesor en esta investigación, por ser un excelente docente impartidor de sus conocimientos y una gran persona, e Ing. Álvaro Rivera por sus enseñanzas y dedicar parte de su tiempo en consultas para hacer posible este trabajo, tengo la certeza de que gracias al esfuerzo y conocimiento de ambos este TIC se desarrolló y se logró con éxito. A los “Pablitos team” del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales con quienes a pesar de compartir poco tiempo tuve el privilegio de formar una sincera amistad. Y finalmente quiero expresar mis más grandes agradecimientos a quienes forman parte de la Empresa Novopan de Ecuador, por permitirme el acceso a sus instalaciones para trabajar en conjunto y por brindarme su apoyo tanto en las prácticas comunitarias como en este TIC.

Claire

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ILUSTACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xviii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xx
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1	Planteamiento del problema.....	2
1.2	Objetivos.....	2
1.2.1	<i>Objetivo general</i>	2
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	2
1.3	Justificación.....	2
1.4	Hipótesis.....	3
1.4.1	<i>Hipótesis nula</i>	3
1.4.2	<i>Hipótesis alternante</i>	3

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1	Gonipteus sp.	4
2.1.1	<i>Origen</i>	4
2.1.2	<i>Historia</i>	4
2.1.3	<i>Taxonomía</i>	6

2.1.4	<i>Gonipterus sp. en Ecuador</i>	7
2.1.5	<i>Gonipterus sp. en plantaciones forestales de Eucalipto</i>	8
2.2	Las plagas	8
2.2.1	<i>Manejo Integrado de Plagas</i>	8
2.3	Control biológico	9
2.3.1	<i>Hongos entomopatógenos</i>	10
2.3.2	<i>Mecanismo de hongos entomopatógenos</i>	11
2.3.3	<i>Características de la pared celular de los hongos</i>	12
2.4	Métodos para aislamiento de entomopatógenos	13
2.4.1	<i>Método de lavado o diluciones seriadas</i>	13
2.4.2	<i>Método de aislamiento por siembra directa</i>	13
2.5	Medio de cultivo	14
2.5.1	<i>Papa Dextrosa Agar (PDA)</i>	14
2.6	Género <i>Eucalyptus</i>	14
2.6.1	<i>Origen</i>	14
2.6.2	<i>Historia</i>	15
2.6.3	<i>Taxonomía</i>	16
2.6.4	<i>Eucaliptos en Ecuador</i>	17

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	19
3.1	Caracterización del lugar	19
3.1.1	<i>Área de estudio</i>	19
3.1.2	<i>Ubicación geográfica de la zona de estudio</i>	19
3.1.3	<i>Condiciones climáticas</i>	20
3.1.4	<i>Selección de las zonas del muestreo</i>	20
3.1.5	<i>Localización del laboratorio</i>	21
3.2	Equipos y materiales	21

3.2.1	<i>Equipo para el muestreo en campo</i>	21
3.2.2	<i>Materiales para el muestreo en campo</i>	21
3.2.3	<i>Equipo para laboratorio</i>	21
3.2.4	<i>Materiales para laboratorio</i>	22
3.2.5	<i>Reactivos e insumos</i>	22
3.2.6	<i>Material biológico</i>	22
3.3	Metodología	22
3.3.1	<i>Obtención de muestras entomológicas de dos haciendas “Pisangacho” y “La Magdalena” provincia Imbabura</i>	22
3.3.2	<i>Aislamiento por diluciones seriadas de entomopatógenos en <i>Gonipterus</i> sp.</i>	23
3.3.3	<i>Aislamiento directo de entomopatógenos en <i>Gonipterus</i> sp.</i>	24
3.3.4	<i>Caracterización cultural</i>	25
3.3.5	<i>Caracterización morfológica</i>	26
3.3.6	<i>Caracterización molecular</i>	27

CAPITULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	31
4.1	Datos de las muestras a estudiar	31
4.1.1	<i>Individuos parasitados en diferentes colectas y haciendas</i>	31
4.1.2	<i>Individuos parasitados de diferentes colectas y haciendas</i>	39
4.2	Metodología por diluciones seriadas	45
4.2.1	<i>Morfotipos de solución madre</i>	45
4.2.2	<i>Morfotipos de diluciones seriadas</i>	48
4.3	Metodología de aislamiento directo	52
4.4	Comparación de aislamientos para hongos entomopatógenos en <i>Gonipterus</i> sp.	53
4.5	Caracterización de entomopatógenos	53
4.5.1	<i>Morfotipos por diluciones seriadas</i>	54
4.5.2	<i>Morfotipos por aislamiento directo</i>	57

4.6	Discusiones	71
------------	--------------------------	-----------

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
-----------	--	-----------

5.1	Conclusiones	78
------------	---------------------------	-----------

5.2	Recomendaciones	78
------------	------------------------------	-----------

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Taxonomía de <i>Gonipterus</i> sp.....	6
Tabla 2-2: Ciclo biológico de <i>Gonipterus</i> sp.	6
Tabla 3-2: Taxonomía del Eucalipto.....	16
Tabla 4-2: Caracterización botánica del género <i>Eucalyptus</i>	16
Tabla 1-3: Ubicación geográfica de dos haciendas de la empresa Novopan del Ecuador S.A..	19
Tabla 2-3: Condiciones climáticas de las dos haciendas de la empresa Novopan del Ecuador S.A. ubicadas en la provincia de Imbabura.	20
Tabla 3-3: Ubicación geográfica del laboratorio de Fitopatología.	21
Tabla 4-3: Características culturales.	25
Tabla 5-3: Primers usados para las PCR.	29
Tabla 1-4: Individuos parasitados en colecta N°1.	31
Tabla 2-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°1 en la hacienda Pisangacho.	35
Tabla 3-4: Individuos parasitados en colecta N°2.	35
Tabla 4-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho.	39
Tabla 5-4: Especificación de las muestras de la colecta N°1.....	39
Tabla 6-4: Especificación de las muestras de la colecta N°2.....	40
Tabla 7-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho.	43
Tabla 8-4: Promedio de muestras en solución madre.	45
Tabla 9-4: Intervalo de confianza para la riqueza de especies en dilución solución madre de aislados en diferentes rodales	46
Tabla 10-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Shannon en solución madre de aislados en diferentes rodales	47
Tabla 11-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Simpson en dilución solución madre de aislados en diferentes rodales	48
Tabla 12-4: Promedio de muestras en dilución 10 ⁻¹	48

Tabla 13-4: Intervalo de confianza para la riqueza de especies en dilución 10^{-1} de aislados en diferentes rodales.....	49
Tabla 14-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Shannon en dilución 10^{-1} de aislados en diferentes rodales.....	50
Tabla 15-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Simpson en dilución 10^{-1} de aislados en diferentes rodales.....	51
Tabla 16-4: Resultados por siembra directa.....	52
Tabla 17-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Fusarium</i> sp.....	58
Tabla 18-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Beauveria bassiana</i>	60
Tabla 19-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Beauveria bassiana</i>	62
Tabla 20-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Alternaria arborescens</i> . .	65
Tabla 21-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Epicoccum nigrum</i>	67
Tabla 22-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Fusarium</i> sp.....	70

ÍNDICE DE ILUSTACIONES

Ilustración 1-2:	Mecanismo de infección de entomopatógenos.	11
Ilustración 1-3:	Rodales de la hacienda “Pisangacho”.	19
Ilustración 2-3:	Rodales de la hacienda “La Magdalena”.	20
Ilustración 3-3:	Características culturales de las colonias.	26
Ilustración 4-3:	Esquema de la extracción de ADN.	28
Ilustración 1-4:	Número de individuos parasitados de la colecta N°1.	31
Ilustración 2-4:	Adulto de <i>Gonipterus</i> sp. parasitado colectado (Código-M33). a) Vista posterior horizontal del cuerpo. b) Vista posterior de la cabeza. c) Vista posterior vertical del cuerpo. d) Vista lateral del cuerpo.	32
Ilustración 3-4:	Larva en etapa final de <i>Gonipterus</i> sp. momificada colectada (Código-M53). a) Vista frontal horizontal. b) Vista posterior horizontal.	33
Ilustración 4-4:	Larva en etapa final de <i>Gonipterus</i> sp. momificada colectada (Código-M63). a) Vista frontal horizontal. b) Vista posterior horizontal.	34
Ilustración 5-4:	Número de individuos parasitados de la colecta N°2.	36
Ilustración 6-4:	Larva en etapa indefinida de <i>Gonipterus</i> sp. momificada colectada (Código-M51). a) Vista frontal en posición diagonal. b) Vista posterior en posición diagonal.	36
Ilustración 7-4:	Adulto de <i>Gonipterus</i> sp. parasitado colectado (Código-M85). a) Vista lateral derecha. b) Vista frontal del cuerpo. c) Vista posterior del cuerpo. d) Vista lateral izquierda.	37
Ilustración 8-4:	Adulto muerto de <i>Gonipterus</i> sp. parasitado colectado (Código-M86). a) Vista posterior del cuerpo. b) Vista lateral. c) Vista frontal del cuerpo. d) Vista posterior vertical.	38.
Ilustración 9-4:	Número de individuos parasitados de la colecta N°2.	40
Ilustración 10-4:	Larva en etapa inicial de <i>Gonipterus</i> sp. parasitada colectada (Código-M89). a) Vista lateral del cuerpo. b) Vista lateral fragmentada en dos. c) Vista frontal del cuerpo. d) Vista lateral en el lente de 40x.	41
Ilustración 11-4:	Larva en etapa final de <i>Gonipterus</i> sp. momificada colectada (Código-M54). a) Vista frontal. b) Vista posterior.	42

Ilustración 12-4: Adulto de <i>Gonipterus</i> sp. descompuesto colectado (Código-M84). a) Vista lateral del lado derecho. b) Vista posterior. c) Vista lateral del abdomen en el lente de 40x. d) Vista frontal.....	43
Ilustración 13-4: Abundancia los morfotipos obtenidos en solución madre en cada una de las muestras.....	45
Ilustración 14-4: Abundancia los morfotipos obtenidos obtenido en dilución 10^{-1} en cada una de las muestras.	49
Ilustración 15-4: Índice de riqueza de especies entre solución madre y dilución 10^{-1}	51
Ilustración 16-4: Índice de Shannon entre solución madre y dilución 10^{-1}	51
Ilustración 17-4: Índice de Simpson entre solución madre y dilución 10^{-1}	52
Ilustración 18-4: Interpretación de los morfotipos obtenidos en aislamiento directo.	52
Ilustración 19-4: Representación de morfotipos en 2 diferentes aislamientos.	53
Ilustración 20-4: Características culturales de del morfotipo 89-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	54
Ilustración 21-4: Características culturales de del morfotipo 88-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	54
Ilustración 22-4: Características culturales de del morfotipo 88-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	55
Ilustración 23-4: Características culturales de del morfotipo 86-R3: Dilución seriada. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	55
Ilustración 24-4: Características culturales de del morfotipo 87-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	56
Ilustración 25-4: Características culturales de del morfotipo 85-R1: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	56
Ilustración 26-4: Características culturales de <i>Fusarium</i> sp. a) Lado anverso. b) Lado reverso.	57
Ilustración 27-4: Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp. a) El 1 indica una microconidias. b) El 2 señala una macroconidias.	57
Ilustración 28-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R2(2): 455, en el programa Chromas 2.6.6.	58
Ilustración 29-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 517.....	58

Ilustración 29-4: Características culturales de <i>Beauveria bassiana</i> . a) Lado anverso. b) Lado reverso.....	59
Ilustración 30-4: Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> . a) El 1 señala esporas esféricas levemente ovadas. b) El 2 indica la proliferación simpodial del conidióforo.....	60
Ilustración 31-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R3(2): 491, en el programa Chromas 2.6.6.	61
Ilustración 32-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 528.....	61
Ilustración 33-4: Características culturales de <i>Beauveria bassiana</i> . a) Lado anverso. b) Lado reverso.....	61
Ilustración 34-4: Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> . a) El 1 indica conidióforos con esporas en cadena. b) El 2 señala la maduración de un conidióforo. ..	62
Ilustración 35-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R4: 495, en el programa Chromas 2.6.6.....	63
Ilustración 36-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 528.....	63
Ilustración 37-4: Características culturales de <i>Alternaria arborescens</i> . a) Lado adverso. b) Lado reverso.....	64
Ilustración 38-4: Características morfológicas de <i>Alternaria arborescens</i> . a) El 1 indica un conidióforo a partir de micelio.....	64
Ilustración 39-4: Cromatograma secuencial de la muestra 85-R(1): 517, en el programa Cromas 2.6.6.....	65
Ilustración 40-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 570.....	65
Ilustración 41-4: Características culturales de <i>Epicoccum nigrum</i> . a) Lado adverso. b) Lado reverso.....	66
Ilustración 42-4: Características morfológicas de <i>Epicoccum nigrum</i> . a) El 1 indica blastoconidios verrugosos y esféricos. b) El 2 señala conidios sin presencia de esporangios.....	67
Ilustración 43-4: Cromatograma secuencial de la muestra 86-R1(2): 442, en el programa Chromas 2.6.6.	68
Ilustración 44-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 516.....	68
Ilustración 45-4: Características culturales de <i>Fusarium</i> sp. a) Lado adverso. b) Lado reverso.	69

Ilustración 46-4: Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp. a) El 1 indica clamidósporas en cadena y en racimo. b) El 2 señala conidiósporos monofialides.....	69
Ilustración 47-4: Cromatograma secuencial de la muestra 86-R3(1): 467, en el programa Chromas 2.6.6.	70
Ilustración 48-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 583.....	71
Ilustración 49-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 583.....	73
Ilustración 50-4: Abundancia de filo de los posibles hongos entomopatógnos.....	76
Ilustración 51-4: Abundancia de género de los posibles hongos entomopatógnos.....	76

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** COLECTAS EN CAMPO
- ANEXO B:** AISLAMIENTO DIRECTO
- ANEXO C:** CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS (MÉTODO CASTELLANI)
- ANEXO D:** CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
- ANEXO E:** LISIS FÍSICA
- ANEXO F:** LISIS QUÍMICA
- ANEXO G:** CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (PCR Y ELECTROFORESIS)
- ANEXO H:** AISLAMIENTO POR DILUCIONES SERIADAS
- ANEXO I:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA
- ANEXO J:** PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA
- ANEXO K:** PREPARACIÓN DE LACTOGLICEROL
- ANEXO L:** RIQUEZA DE ESPECIES, ÍNDICE DE SHANNON E ÍNDICE DE SIMPSON TOTALES DE LOS MORFOTIPOS POR DILUCIONES SERIADAS ENTRE LAS HACIENDAS DE LA HACIENDA PISANGACHO
- ANEXO M:** RIQUEZA DE ESPECIES, ÍNDICE DE SHANNON E ÍNDICE DE SIMPSON TOTALES DE LOS MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE ENTRE LAS HACIENDAS DE LA HACIENDA PISANGACHO
- ANEXO N:** RESUMEN DE LA RIQUEZA DE ESPECIES ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCION 10^{-1} EN LOS RODALES E LA HACIENDA PISANGACHO
- ANEXO Ñ:** RESUMEN DEL INDICE DE SHANNON ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCION 10^{-1} EN LOS RODALES E LA HACIENDA PISANGACHO
- ANEXO O:** RESUMEN DE LA RIQUEZA DE ESPECIES ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCION 10^{-1} EN LOS RODALES E LA HACIENDA PISANGACHO

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribo Nucleico
TBE	Tris Borato Edta
D	Simpson Diversity
Ha	Hectáreas
H'	Shannon Diversity
ID	Índice de Diversidad
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
MIP	Manejo Integrado de Plagas
NCBI	National Center Biotechnology Information
OUT	Operative Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
RS	Species Richness
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

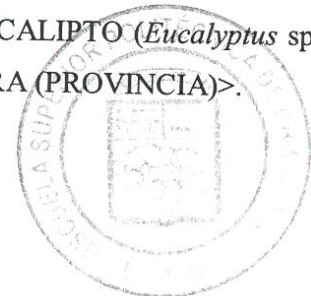
RESUMEN

La siguiente investigación propuso realizar una biosprospección o búsqueda de entomopatógenos en la plaga introducida gorgojo del Eucalipto (*Gonipterus* sp.), presente en plantaciones forestales del género Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) de la empresa Novopan del Ecuador. La colecta de los insectos parasitados fue plasmada en la provincia de Imbabura, en dos diferentes haciendas de los predios Novopan: hacienda Pisangacho, cantón San Miguel de Urcuquí y hacienda La Magdalena, cantón Ibarra. Dentro del primer objetivo se planteó dos metodologías de aislamiento para obtener un potencial de posibles hongos entomopatógenos, la primera metodología consistió en aislar morfotipos a través de diluciones seriadas, donde las muestras entomológicas parasitadas se sumergieron en solución salina y se dividieron en: solución madre - dilución 10^{-1} y la segunda metodología se basó en aislar morfotipos directamente del micelio cubierto en los insectos parasitados; los resultados de estas dos metodologías de aislamientos fueron colocados en la incubadora a una temperatura de 26 °C durante 15 días; para el segundo objetivo se caracterizó: culturalmente, morfológicamente y molecularmente únicamente los resultados de la metodología por aislamiento directo. Gracias a estas dos metodologías de aislamiento se observaron variedades de morfotipos, sin embargo, la mejor metodología fue la de aislamiento por diluciones seriadas con un total de 611 hongos, mientras que la metodología por aislamiento directo tuvo un total de 6 hongos, siendo estos 6 hongos según su caracterización cultural, morfológica y molecular: *Fusarium* (*Fusarium* sp.), *Beauveria* (*Beauveria bassiana*), *Beauveria* (*Beauveria bassiana*), *Epicoccum* (*Epicoccum nigrum*), *Alternaria* (*Alternaria arborescens*), y *Fusarium* (*Fusarium* sp.). Se recomienda inocular los 6 hongos en el estadio adulto de la plaga para concretar si existe un control biológico y amplificar los aislados de metodología directa que no lograron ser identificados para determinar el papel que desempeñan.

Palabras clave: <AISLAMIENTO DIRECTO>, <BEAVERIA (*Beauveria bassiana*)>, <DILUCIONES SERIADAS>, <ENTOMOPATÓGENOS>, <EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.)>, <GORGOJO DEL EUCALIPTO (*Gonipterus* sp.)>, <IMBABURA (PROVINCIA)>.



D.B.R.A.
Ing. Cristian Castillo




1619-DBRA-UPT-2023.

ABSTRACT

The research proposed carrying out a bioprospecting or search for entomopathogens in the introduced pest Eucalyptus weevil (*Gonipterus sp.*), present in forest plantations of the genus Eucalyptus (*Eucalyptus spp.*) of the company Novopan del Ecuador. The collection of parasitized insects was recorded in the province of Imbabura, in two different farms of the Novopan properties: Pisangacho farm, San Miguel de Urcuquí canton, and La Magdalena Farm, Ibarra city. Within the first objective, two isolation methodologies were proposed to obtain a potential for possible entomopathogenic fungi. The first methodology consisted of isolating morphotypes through serial dilutions, where the parasitized entomological samples were submerged in saline solution and divided into: mother solution - dilution 10-1, and the second methodology was based on isolating morphotypes directly from the mycelium covered in the parasitized insects; the results of these two isolation methodologies were placed in an incubator at a temperature of 26 °C for 15 days; For the second objective, only the results of the direct isolation methodology were characterized: culturally, morphologically and molecularly. Thanks to these two isolation methodologies, varieties of morphotypes were observed. However, the best method was the isolation by serial dilutions with 611 fungi. In comparison, the direct isolation methodology had a total of 6 fungi, these being six fungi according to their cultural, morphological and molecular characterization: *Fusarium (Fusarium sp.)*, *Beauveria (Beauveria bassiana)*, *Beauveria (Beauveria bassiana)*, *Epicoccum (Epicoccum nigrum)*, *Alternaria (Alternaria arborescens)*, and *Fusarium (Fusarium sp.)*. It is recommended to inoculate the six fungi in the adult stage of the pest to determine if there is a biological control and to amplify the direct methodology isolates that could not be identified to determine their role.

Keywords: <DIRECT ISOLATION>, <BEAUVERIA (*Beauveria bassiana*)>, <SERIAL DILUTIONS>, <ENTOMOPATHOGENS>, <EUCALYPTUS (*Eucalyptus spp.*)>, <EUCALYPTUS WEEVIL (*Gonipterus sp.*)>, <IMBABURA (PROVINCE)>.



PhD. Dennys Tenelanda López
ID number: 0603342189

Riobamba, August 7th, 2023.

INTRODUCCIÓN

Jiménez (2009, p.06) menciona a las plagas como poblaciones de insectos fitófagos, que se alimentan de material vegetal disminuyendo a las plantaciones y cultivos, reducen el valor de la cosecha o aumentan los costos en la producción. Las mismas están estrechamente relacionadas con el criterio económico el cual se ve afectado en el sector industrial y empresarial causado por la proliferación de una plaga (FAO, 2021, p.01).

El control biológico o biocontrol es una estrategia donde mejoran las condiciones de vida de ciertos enemigos naturales de las plagas, este método de manejo de plagas es el más compatible con el ambiente ofreciendo múltiples beneficios en la economía del sector forestal o agrícola y la protección al medio ambiente (Meyling y Eilenberg, 2007, p.145).

Los hongos entomopatógenos a lo largo de los años han desempeñado un papel bastante importante en el control biológico, los diferentes géneros de hongos patógenos con éxito y potencial varían, siendo estos: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria/Paecilomyces* y *Lecanicillium*. El principal obstáculo para una mayor explotación de hongos es el escaso conocimiento de la interacción huésped-patógeno a nivel de genotipo fúngico (Jensen et al., 2009, p.07).

Para Pucheta et al., (2006, p.856) los hongos entomopatógenos poseen un elevado potencial como agentes de control biológico ya que conforman un grupo de aproximadamente 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos. El éxito de los entomopatógenos se halla en función de la biología de los insectos plaga y del medio ambiente en el que se localizan para de esta manera elegir a la especie adecuada y aplicarla en el momento más oportuno, frecuentemente los hongos infectan a los insectos mediante la penetración en su cutícula volviéndose una gran opción para el control de insectos (Motta y Murcia, 2011, p.77). La infección puede suceder por la ingestión indirecta o aberturas externas, una vez que el hongo se encuentra dentro del insecto coloniza su interior, en un inicio la infección puede o no observar síntomas pero el insecto comienza a perder apetito y movilidad, en un periodo entre 7 o 10 días el insecto muere debido a la deficiencia nutricional, existen hongos que producen toxinas durante su crecimiento haciendo que estos compuestos provoquen su muerte en 48 horas, al morir el insecto o antes de hacerlo el hongo construye estructuras reproductivas permitiendo su rápida dispersión a través de una población y causan el colapso en pocas semanas (Lizardo, 2016, p.75).

Existen diversos tipos de patógenos entre ellos: hongos, bacterias, nematodos y virus (Maruce y Apre, 2011, p.08).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La empresa Novopan del Ecuador S.A. dispone de grandes plantaciones forestales del género *Eucalyptus*, los cuales están siendo atacadas por una plaga introducida llamada *Gonipterus* sp. y ha logrado establecerse en estas plantaciones afectando el crecimiento y desarrollo de los árboles causándoles raquitismo hasta provocar su muerte. En la actualidad, en Ecuador no se han reportado estudios científicos que concreten alternativas de metodologías de aislamientos para la obtención de hongos entomopatógenos asociados a la plaga *Gonipterus* sp. y para el control de su manejo integrado.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo general*

Realizar una bioprospección de entomopatógenos en *Gonipterus* sp. presentes en plantaciones forestales del género *Eucalyptus* de la empresa Novopan del Ecuador.

1.2.2 *Objetivos específicos*

Evaluar metodologías de aislamiento de posibles entomopatógenos.

Caracterizar los entomopatógenos recolectados.

1.3 Justificación

Según estudios científicos los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* han sido usados como el controlador biológico más exitoso, resultando ser los más efectivos y eficaces para un manejo integrado, para esto es necesario fomentar un banco de hongos entomopatógenos que disponga más opciones de hongos entomopatógenos y realizar rotaciones, dicha empresa dispone colaborar y apoyar con esta investigación.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Hipótesis nula

No se encuentra ningún entomopatógeno asociado a la plaga *Gonipterus* sp. en el área muestreada.

1.4.2 Hipótesis alternante

Se encuentra al menos un entomopatógeno asociado a la plaga *Gonipterus* sp. en el área muestreada.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Gonipteus* sp.

2.1.1 *Origen*

El género *Gonipterus* fue descrito por Schoenherr y está conformado por aproximadamente 20 especies descritas con gran polémica por su confusa identificación. Su distribución natural se encuentra: al oeste de Australia, Queensland, Tasmania y al este de Australia (García, 2008, p.03).

Gonipterus sp., también conocido comúnmente como el gorgojo del Eucalipto, es un insecto australiano perteneciente a la familia *Curculionidae* y defoliador específico de *Eucalyptus* spp. Se considera una de las plagas más severas en su lugar de origen que ha ocasionado daños a los Eucaliptos de Australia y Tasmania, países de donde es nativo este árbol (Withers, 2001, p.467). El crecimiento de las poblaciones del gorgojo depende de: temperaturas templadas, precipitaciones con largos periodos y la ausencia de enemigos naturales (Huerta et al., 2008, p.329).

Por ende, para Culot el clima de estas regiones australianas se define como mesotermal húmedo sin estación seca, donde la temperatura anual se aproxima a los 14 °C, con temperaturas estivales de 20 °C e invernales de 8 °C; precipitaciones totalizadas en 970 mm anuales; y heladas hasta -2 °C anuales (Penón et al., 2010, p.03). El Eucalipto introducido en la Sierra del Ecuador se distribuye desde los 1800 hasta los 2 900 m.s.n.m., oscilando a una temperatura entre 8 °C - 20° C, y una precipitación anual entre los 600 - 800 mm (Acosta, 1949, p.10).

Según Avilés (2019, p.05) el negocio del Eucalipto por el mundo hizo que el insecto plaga se extendiera por los países donde actualmente este género se comercializa, se ha estimado que la pérdida de madera comercial oscila entre el 29 - 86 % con niveles de defoliación del 50 al 100 %.

2.1.2 *Historia*

La plaga del gorgojo llegó hasta Nueva Zelanda en el año de 1 890 según dos teorías: en la primera se pensó que pudieron haber sido transportados en las mismas plantulas ya que en un inicio eran importados los Eucaliptos; y en la segunda los gorgojos provinieron directamente de Australia o Tasmania a los diferentes rincones del mundo donde se ha adaptado el Eucalipto, el 38 % de los

insectos australianos en Nueva Zelanda fueron colectados en la región de Auckland (Marelli, 1927, p.263).

En un estudio de Rabasse et al., citado por Mansilla (1942, p.549) la plaga fue detectada fuera de su área por primera vez en el año 1916 en la capital de Sudáfrica, Ciudad del Cabo. En 1925 se expandió hasta las provincias de: Transvaal y Natal provocando arduos daños. En el año 1938 *Gonipterus* sp. se reportó en la capital de Mozambique, Maputo y al sur del país Malawi. Más adelante, el año 1940 la plaga ya se había extendido hasta el sureste de Zimbabwe y en 1944 ya se estaba propagado en los países de: Kenia y al oeste de Uganda (Schröder et al., 2019, p.08).

Mansilla (1942, p.549) de acuerdo con Sampo, en 1976 la plaga dio un salto en los países europeos apareciendo en la Riviera italiana en Liguria y destruyendo a las plantaciones de *Eucalyptus globulus* para el comercio de ramas ornamentales razón por la cual se introducía esta especie. Dos años después en julio de 1978 en Mentón (Francia) aparecen una infestación de larvas y adultos de *Gonipterus* sp. sobre las plantaciones *Eucalyptus globulus*. Estaba anunciado que esta plaga llegaría a Galicia región de España, los primeros daños se detectaron en la parroquia de Lourizán, donde el insecto plaga llegó en 1991 e inició su dispersión por todo Galicia. En septiembre del año 1997 prácticamente se encontraba en todos los Eucaliptos gallegos; el occidente asturiano; y el norte de los países Portugal hasta Extremadura unión de las provincias de Cáceres y Badajoz (Vergara, 2016, p.01).

En la última década *Gonipterus* sp. ha aumentado su tasa de colonización en el mundo. Llegó a expandirse en plantaciones de Norteamérica y Sudamérica, existen cuatro especies de gorgojos registradas y se han reportado en los países de: Brasil, Chile, Argentina y Uruguay; actualmente en Colombia y Ecuador ya existen estudios sobre el complejo de esta plaga amenazando al resto de países del continente (Rodas & Madrigal, 2016, p.01).

Huerta et al., (2008, p.327), señalan a la plaga específica del género *Eucalyptus* detectada en 1998 por primera vez en Sudamérica en las regiones de Chile afectando a más de 525 mil hectáreas de Eucaliptos. Según el pensamiento de Tooke, considera que el elevado potencial del crecimiento de las poblaciones del gorgojo se debe a: la temperatura, la abundancia de hospedantes de su preferencia, las condiciones del clima templado en especial lluvias o precipitaciones, y la ausencia de enemigos naturales; siendo estos los factores determinantes del ciclo biológico del insecto (González et al., 2010, p.25). En Brasil Estay et al., (2002, p.395), registró una sola generación anual del ciclo vital del insecto, considerando al clima tropical del sur de Brasil no favorable para el desarrollo de la plaga, debido al alto régimen de lluvias.

Se especuló que las poblaciones invasoras de *Gonipterus* era una sola especie *G. scutellatus*, sin embargo, estudios realizados por Mapondera et al., (2012, p.175) reconocen actualmente tres especies más descritas y cuatro no descritas en Australia, las especies invasoras son: *G. platensis* nativo de Tasmania e invasor en América del Norte y del Sur, partes de Europa y Australasia; *G. pulverulentus* endémico de Nueva Gales del Sur, Australia y Tasmania e invasor en América del Sur; y *Gonipterus* sp. nativo del este de Australia continental e invasor en Australia Occidental, Tasmania, África y partes de Europa.

2.1.3 Taxonomía

Tabla 1-2: Taxonomía de *Gonipterus* sp.

REINO	<i>Animalia</i>
FILO	<i>Arthropoda</i>
CLASE	<i>Insecta</i>
FAMILIA	<i>Cuculionidae</i>
GÉNERO	<i>Goniptetus</i>

Fuente: Mansilla, 1942, p.548.

Realizado por: Romero, 2023.

Beéche et al., (1999, p.11) menciona que el ciclo de vida del insecto varía entre 3 - 10 meses, dependiendo de las condiciones climáticas del área. Todos los coleópteros como estos gorgojos son holometábolos, es decir muestran metamorfosis completa que atraviesa las fases de: huevo, larva, pupa y adulto. En condiciones normales, puede presentar dos ciclos dentro del mismo año, aunque excepcionalmente pueden darse casos de 3 - 4 ciclos.

Tabla 2-2: Ciclo biológico de *Gonipterus* sp.

Estadío	Descripción
Huevo	Los huevos son subcilíndricos, de color amarillo traslúcido y lisos. Miden de 1,2 a 2 mm de largo por 0,5 a 1 mm de diámetro y están cubiertos por una ooteca (cápsula grisácea) o una capa de excremento que se endurece al contacto con el aire, cada cápsula contiene aproximadamente de 8 - 10 huevos, los cuales eclosionan después de 14 - 16 días.
Larva	Las larvas miden 2,7 mm de longitud en estado temprano a 12 mm en estados más avanzados y permanecen en ese estadio entre 28 - 40 días. La cabeza es de color negro y el cuerpo es amarillo-verdoso presenta dos bandas laterales oscuras y una más tenue en la zona media de su dorso, sobre cada segmento

	se observan puntos negros y brillantes con una pequeña espina a la que se adhiere un hilo de excremento característico del gorgojo. La larva presenta 4 instares y en su último estadio larval busca el suelo para empupar.
Pupa	El estadio de pupa sucede en el suelo a una profundidad entre 2 - 5 cm, son de color amarillo claro presentando cuerpos alargados de 7 - 11 mm y duran entre 30 - 40 días.
Adultos	El gorgojo tiene medidas entre 7 - 9 mm de largo y 4 - 5 mm de ancho, este estadio dura entre 2 - 3 semanas. Su coloración varía desde gris claro hasta café oscuro o rojizo uniformemente, dependiendo del estado de desarrollo y condiciones ambientales. La superficie ventral es de un color más brillante que la dorsal, presentan cuatro prominencias a lo largo del frente de cada élitro, su cuerpo está cubierto de pequeñas escamas y presenta patas robustas bien definidas. Cuando son molestados, se desprenden de las hojas dejándose caer al suelo como un mecanismo de defensa.

Fuente: Rodas, 2016, pp.03-06

Realizado por: Romero, 2023.

2.1.4 *Gonipterus* sp. en Ecuador

Según el Inabio (2023, p.01) la plaga del Eucalipto en la actualidad se halla dispersa en diversos países del Neotrópico sumando a Ecuador, en donde se registró por primera vez un acercamiento complicado por *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal fue en el año 2 019.

En el año 2 020 *Gonipterus* sp. ya se encontraba localizado en algunos bosques Metropolitanos de Quito y comunidades rurales a la capital. La propagación de este gorgojo en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) fue posible gracias a las condiciones ambientales como la temperatura y la precipitación. La temperatura promedio mensual es de aproximadamente 13,7 °C, variando entre 7 - 21 °C y la precipitación media anual es de 11 000 mm, posee dos épocas bien marcadas de precipitaciones: la seca y la lluviosa. El proceso de establecimiento de las poblaciones de *Gonipterus* sp. se vió beneficiada por la ausencia de enemigos naturales (Cárdenas & Correa, 2021, p.05).

Para Salazar et al., (2023, p.02) la presencia del insecto plaga en el país ha despertado una gran preocupación en el sector forestal, que ha desempeñado estrategias para la implementación de un manejo integrado. Al saber que los gorgojos se alimentan de los brotes de los árboles de Eucalipto, los mismo se distribuyen en la Sierra ecuatoriana (El Comercio, 2017: 1A). Esta plaga se encuentra

actualmente en las plantaciones de las provincias de: Carchi, Imbarura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Bolivar, Azuay y Loja (León, 2006, p.31).

2.1.5 *Gonipterus* sp. en plantaciones forestales de Eucalipto

Es uno de los insectos que ha provocado grandes daños en plantaciones de Eucaliptos, siendo detectado en 1916 por primera vez y afectando a más de 525 mil hectáreas (Ha) de *Eucalyptus*. El insecto plaga ataca principalmente a las especies: *Eucalyptus maideni*, *E. viminalis*, *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. robusta*, *E. citriodora* y *E. smithii*. En cambio, *E. saligna*, *E. cladocalyx*, *E. melliodora*, *E. crebra*, *E. fastigata*, *E. paniculata* y *E. maculata* (FAO, 1958, p.01).

Según el pensamiento de Tooke, citado por Schröder et al., (2021, p.02) en los adultos, las hembras ovipositan hasta 10 huevos cubiertos por ootecas en hojas nuevas y al eclosionar las larvas se alimentan de la epidermis de los nuevos brotes de hojas ocasionando debilidad en la corona del árbol y una pérdida significativa de rendimiento. Tanto los escarabajos adultos como las larvas se alimentan de hojas, sin embargo, las larvas provocan la mayor parte del daño en este género.

Huerta (2008, p.329) de acuerdo con el pensamiento de Floyd y Foley, indica que la resistencia de especies del género Eucalipto a plagas puede deberse a la composición química de las hojas, se ha observado una relación entre la concentración de 1,8 cineol un monoterpeno o sideroxilonal, que se encuentran en los aceites esenciales de las hojas y hace al género susceptible a fitófagos.

2.2 Las plagas

Son consideradas un problema mundial ya que representan una pérdida del 20 y 30 % en el rendimiento de producción. Se calcula que existen aproximadamente 67 000 especies de plagas que arrasan con las plantaciones forestales y los cultivos agrícolas, dentro del grupo de plagas están calificadas: las plantas, los animales, los insectos, los microbios u otros organismos que interfieren con la actividad humana (Carbajal et al., 2019, p.05).

El término plaga en el sector forestal y agrícola implica para los productores la acción de control sobre la misma (Villacide y Corley, 2011, pp.12-13).

2.2.1 *Manejo Integrado de Plagas*

Según el pensamiento de Smith & Reynolds, citado por Melgar et al., (2014, p.204) el Manejo Integrado de Plagas (MIP) significa un sistema de manejo de poblaciones plaga que utilizan técnicas de forma compatible para: reducir mencionadas poblaciones plaga y mantenerlas bajo los niveles capaces de ocasionar daños económicos. El MIP combina e integra métodos: biológicos, químicos, culturales, físicos, etológicos y genéticos.

El Manejo Integrado de Plagas se desarrolló en base a dos factores fundamentales: el primero fue el uso continuo de plaguicidas creador de una crisis del control de plagas debido a la resistencia generada por la misma, y el segundo fue la toma de conciencia para la salud y el medio ambiente ocasionado por el uso intensivo de plaguicidas (Cisneros, 1992, pp.04-05).

La aplicación de las técnicas del manejo de plagas tiene como finalidad prevenir y eliminar el uso de plaguicidas sintéticos que a lo largo de los años han empezado a manifestar efectos notorios y negativos por el uso excesivo de estos en la fitoprotección (Pérez y Vázquez, 2001, p.191).

Para Bejarano (1999, p.23) a pesar de existir escasa información sobre reportes de intoxicaciones ocasionadas por estos químicos en los productores, los plaguicidas provocan fuertes impactos en: el medio ambiental, la alimentación, la salud, el agua y los derechos de la infancia.

2.3 Control biológico

Durante el siglo XX e inicios del siglo XXI, el enfoque del control biológico o biocontrol se basa en la manipulación de enemigos naturales de manera contundente como forma de control de plagas. Ha sido usado en diversos países del mundo para suprimir más de 200 especies de insectos invasores siendo la forma más productiva y de mayor importancia económica (Van Driesche et al., 2009, p.323).

Para Smith y Capinera (2013, p.01) cualquier organismo que se alimenta de otro organismo es considerado como su enemigo natural, los organismos que son enemigos naturales de plagas se llaman organismos benéficos. Todos los seres vivos, tienen enemigos naturales y estos agentes corresponden a: patógenos (hongos, virus, bacterias y protozoos), depredadores y parasitoides. La acción de estos organismos es de suma importancia, ya que ayudan a equilibrar y regular las poblaciones de los individuos atacados disminuyendo el potencial reproductivo de los mismos.

El control biológico es una estrategia utilizada para disminuir las poblaciones de insectos dañinos con enemigos naturales, los organismos introducidos de otros lugares se les conoce como exóticos y a los organismos propios del lugar se les conoce como nativos. Para el control biológico de

organismos exóticos se implica localizar a los enemigos naturales de la plaga e introducirlos en el área donde la plaga exótica ya se haya establecido, cabe recalcar que todos los enemigos naturales exóticos deben ser estudiados cuidadosamente antes de su liberación para no causar un impacto negativo ambiental o económico. Estas estrategias de control son: el control biológico clásico, que es la introducción de especies nuevas o exóticas como agentes de control biológico; y el aumento de enemigos naturales y la conservación de los mismos (Badii et al., 2004, p.04).

2.3.1 Hongos entomopatógenos

La palabra entomopatógeno hace referencia a los microorganismos capaces de ocasionar una enfermedad al mismo insecto, llevándolo a su muerte después de un corto periodo de incubación (Intagri, 2021, p.01). Para Pérez los hongos entomopatógenos forman el grupo de mayor categoría en el control biológico de insectos plaga, ya que son capaces de tolerar enfermedades causadas por hongos y su modo de ataque se ve reflejado en estadios inmaduros (larva o ninfa) (Pacheco et al., 2019, p.07).

Desde hace 4 700 años constan aproximadamente más de 700 especies de hongos asociados a insectos, y los principales géneros son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Hymenostilbe*, *Hirsutella*, *Fusarium*, *Akanthomyces*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Langenidium*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* y *Verticillium*, los cuales se utilizan como productos de control biológico por su facilidad en: manipular, multiplicar, formular, y efectividad en el control de plagas de importancia forestal y agrícola (France et al., 2016, p.01).

Generalmente, estos hongos parasitan en los órdenes Coleóptera, Lepidóptera, Ortóptera y Hemíptera, entre ellos los pocos microorganismos que se pueden parasitar es en las familias Curculiónidos y Escarabeidos. Los hongos usan como fuente de carbono la quitina en la cual forman parte del exoesqueleto del insecto, además de producir varios tipos de toxinas que paralizan o matan su huésped (France et al., 2016, p.01).

Estos microorganismos infectan directamente cuando sus esporas ingresan en contacto con la cutícula del insecto, germinando y creciendo en el interior del cuerpo de su hospedero. El hongo prolifera a través del cuerpo del insecto, produciendo toxinas y consumiendo los nutrientes, eventualmente destruyéndolo. Al inicio de la infección pueden o no observarse síntomas, el insecto comienza a perder movilidad y apetito, luego de una semana o diez días muere debido a la deficiencia nutricional. Para su utilización como control biológico, son necesarias las prácticas forestales y agrícolas para manejar un ambiente benéfico en las poblaciones de hongos entomopatógenos, donde los espacios ecológicos del hongo son necesarios, tales como la

humedad relativa, temperatura, patogenicidad, virulencia y hospederos a los que infecta activamente (Intagri, 2021, p.02).

2.3.2 Mecanismo de hongos entomopatógenos

Para Téllez et al., (2009, p.74), el mecanismo de ataque del hongo en el insecto huésped tiene diferentes etapas divididas en: adherencia del hongo, germinación del hongo, penetración de hifas, producción de metabolitos, muerte del hospedero.

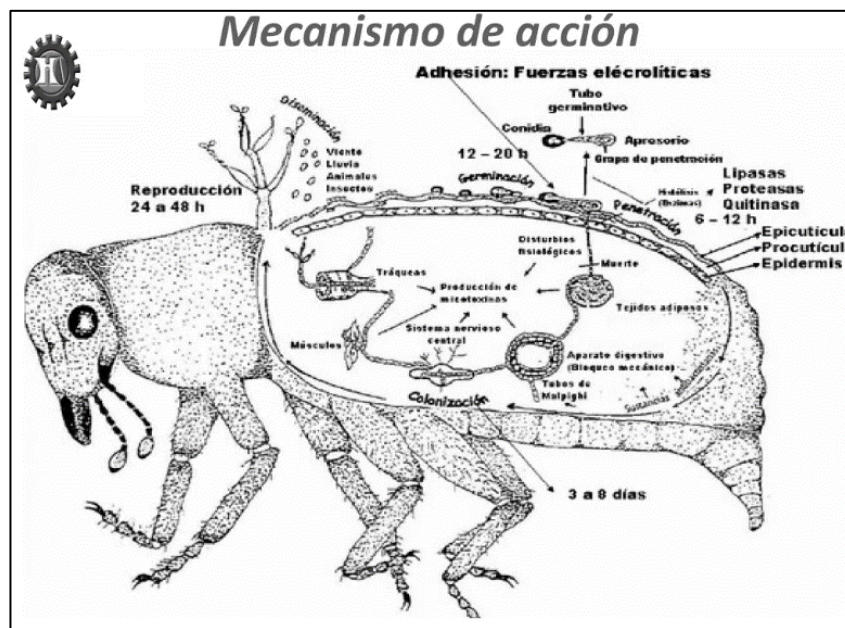


Ilustración 1-2: Mecanismo de infección de entomopatógenos.

Fuente: Lizardo, 2016, p.76

Adhesión de conidias en la cutícula del hospedero: Radica en la fijación de las conidias del hongo en el cuerpo del hospedero, intervienen propiedades fisicoquímicas de las superficies en contacto como: cutícula del hospedero y esporas del hongo (Berretta, 2001, p.10).

Germinación de conidias en la cutícula del hospedero: Proceso mediante el cual una conidia emite varios tubos germinativos que al crecer y alargarse dan origen a las hifas. La germinación de las conidias depende absolutamente de los nutrientes que le pueda brindar el hospedero y las condiciones ambientales que presente el entorno (Echeverría, 2006, p.13).

Penetración de las hifas en el hospedero: Interviene la acción de dos mecanismos: la acción física, que consiste en la presión ejercida por el tubo germinativo del hongo sobre el integumento

del hospedero y la acción química que consiste en la acción enzimática (principalmente: proteasas, lipasas y quitinasas) que degrada la misma zona donde actúa el mecanismo físico. La acción conjunta de ambos mecanismos perfora el integumento del hospedero permitiendo la entrada del hongo en el hemocele de este (Berretta, 2001, p.10; Echeverría, 2006, p.13).

Producción de metabolitos tóxicos: El hongo libera diferentes tipos de toxinas: unas inhiben la acción de los mecanismos de defensa que tiene el hospedero y otras que coadyuvan en su muerte. De esa manera el papel de las toxinas de los hongos entomopatógenos es de gran importancia en el proceso de infección (Noboa & Quelal, 2015, p.20).

Muerte del hospedero: Una vez muerto el hospedero el hongo prolifera formando cuerpos hifales denominados blastosporas que se diseminan a través del hemocele del hospedero. La invasión del hongo en las estructuras del hospedante, como: tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear, se aprovecha de sus nutrientes (Echeverría, 2006, p.13).

Crecimiento y reproducción del hongo: Al terminarse los nutrientes del insecto plaga, el hongo retoma su crecimiento terminando de invadir el interior de su hospedero, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo penetran la cutícula del hospedero desde el interior y emergen a la superficie e inician la formación de esporas (Berretta; 2001, p.10).

2.3.3 Características de la pared celular de los hongos

Pucheta et al., (2006, p.857), menciona a la pared celular de los hongos entomopatógenos integrada por: lípidos, pigmentos, polisacáridos (80 %), proteínas (3 - 20 %) y sales inorgánicas en cantidades mínimas; la quitina está compuesta por microfibrillas siendo el polisacárido característico principal de la pared celular en los hongos e insectos; existen tres tipos de quitina: α , β y γ .

Con el pensamiento de Ruiz, los lípidos en la pared celular de los hongos son considerados ácidos grasos y son los más abundantes. La coloración de la pared celular se debe a la presencia de melaninas producidas por la oxidación de diferentes fenoles, los pigmentos corresponden a su carácter protector ante efectos deletéreos ocasionados por la luz (Pucheta et al., 2006, p.857).

En la pared celular acontecen diversos cambios en las etapas del desarrollo de los hongos, ocurren mediante el ensamblaje de los componentes celulares como: los polisacáridos microfibrilares, la

asociación de polisacáridos de reforzamiento y el complejo de proteínas (glicoproteínas). Las glicoproteínas comienzan su ensamblaje en el interior del retículo endoplásmico rugoso, luego son transportadas a diferentes compartimientos membranosos del retículo endoplásmico liso y del aparato de Golgi hasta alcanzar la superficie celular mediante el aparato vesicular, este conglomerado vesicular traslada a las glicoproteínas y otros componentes hacia la pared celular pasando por la membrana plasmática y siguiendo el camino para integrarse a la pared celular tanto: la formación de la espora y el desarrollo de micelio (Wessels, 1999, p.134).

2.4 Métodos para aislamiento de entomopatógenos

Son procesos que se basan en la obtención del hongo a partir de la fuente del inóculo, los cuales se adquieren a partir de insectos o plantas. A continuación, para estos aislamientos de hongos, se prosigue a la inoculación en un medio de cultivo para la obtención de un cultivo puro, se trata del paso inicial al proceso de producción, un error afecta todo el proceso, debe estar libre de contaminantes y tener buen vigor para un óptimo y rápido crecimiento (Jiménez et al., 2009, p.27).

2.4.1 Método de lavado o diluciones seriadas

Se trata del método de aislamiento más empleado, radica en situar un insecto esporulado en un microtubo para muestras que tiene 10 mL de agua destilada estéril con 0,1% de Tween 80. Debe ser agitada sutilmente por 1 minutos, para que las conidias se despegan del cuerpo del insecto y lo resultante de la mezcla, es una suspensión concentrada del inóculo con otras partículas. Finalmente, dicha suspensión es la solución madre (Jiménez et al., 2009, pp.27-28). A partir de la solución madre, se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}); para la primera dilución (10^{-1}) se transfiere con una pipeta estéril 1 mL de la suspensión a un tubo que contiene 9 mL de agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 80 (Jiménez et al., 2009, pp. 27-28).

2.4.2 Método de aislamiento por siembra directa

Según Jiménez (2009, p.28), esta técnica reside en una obtención directa del hongo, el cual se encuentra visible a simple vista en el cuerpo del insecto, la misma técnica posee una desventaja principal ya que las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y contaminar el aislamiento, es por esto que se recomienda desinfectar externamente al insecto con hipoclorito de sodio entre: 3 - 5 % y se enjuaga con agua destilada estéril.

Este tipo de aislamiento puede ser de dos formas:

El primero, se realiza el raspado partículas del hongo en un insecto desinfectado, utilizando un asa bacteriológica y pasándola en un medio nutritivo. En la segunda forma con una pinza desinfectada se toma el insecto esporulado y se lo agita con movimientos verticales y horizontales, sobre la superficie del medio de cultivo.

2.5 Medio de cultivo

A continuación, el siguiente medio de cultivo es el más empleado en trabajos experimentales para la purificación y obtención de cultivos puros (Cruz, 2000, p.57).

2.5.1 Papa Dextrosa Agar (PDA)

Es un medio de cultivo microbiológico que se prepara a partir de la inclusión de extractos acuosos de tubérculos de papa en crecimiento y dextrosa, la base del medio es altamente nutritiva ya que favorece el crecimiento de hongos y levaduras, permitiendo una adecuada esporulación. Puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano, este medio también es recomendado para realizar el cultivo de hongos y levaduras de importancia (Beever y Bollard, 1960, pp.273-274).

2.6 Género *Eucalyptus*

2.6.1 Origen

El género *Eucalyptus*, pertenece a la familia *Myrtaceae*, representa el carácter del arbusto australiano y posee una diversidad superior a 500 especies. De acuerdo con el estudio de Rokich y Bell, es considerado un extraordinario género con especies adaptadas a diversos hábitats, desde los 0 hasta los 2 300 m.s.n.m., y se hallan en casi todos los tipos de suelos, desde ácidos hasta alcalinos (Granados y López, 2006, p.144).

Su distribución originaria se ubica en territorios insulares. Inician en el norte de Oceanía y terminan en el sur de Asia, en los países de: Papúa, Nueva Guinea y Timor; parte del sur de Indonesia y sur de Filipinas (Barros, 2012, p.77).

En diferentes continentes, existen numerosas especies del género *Eucalyptus*, en plantaciones forestales, actualmente las especies de mayor importancia para plantaciones son: *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus nitens*, *Eucalyptus tereticornis* y

Eucalyptus smithii, para climas templados, y *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus pellita* para climas tropicales (Barros, 2012, p.75).

Las especies del género *Eucalyptus*, gracias a su gran plasticidad ecológica son muy apreciadas para utilizarlas en forestaciones industriales o de protección (Iturrel y Darchuck, 1995, p.11).

2.6.2 Historia

Los Eucaliptos de Tasmania fueron los primeros en ser descubiertos por los europeos; el primer desembarco europeo integrado por navegantes y comerciantes fue el 2 de diciembre de 1642 y, se produjo en la Bahía de Blackman, el grupo liderado, por el comandante Zeehaen y su piloto Francoys Visscher, observó abundancia de excelente madera, con varios árboles de 60 y 65 pies hasta las ramas más bajas, y trajeron con ellos de vuelta una goma que exudaban los árboles, parecida a la goma laca. Curtis y Somerville, sustentan que, por la vegetación y las recolecciones, es probable que, hayan desembarcado en Boomer Creek, en la orilla occidental de Blackman Bay (Reid y Potts, 2003, p.21).

Una reseña del libro de Hay (2021, p.01), narra al botánico Joseph Banks, quien, en su visita por Australia en 1770, visualizó grandes árboles comunes que producían una "goma rojiza" y los nombró "árbol de la goma", Banks recolectó y llevó a su herbario, una gran cantidad de material botánico australiano. Para marzo del 1773 mientras el segundo barco de expedición de Cook, se dirigía a Nueva Zelanda bajo el mando del capitán Tobias Furneaux, aterrizaron brevemente en la isla Bruny y recolectaron los primeros especímenes de semillas. Años después más muestras fueron recolectadas por William Anderson y su asistente David Nelson, cuando los dos barcos de Cook fueron anclados en Adventure Bay del 26 al 30 de enero de 1777. Anderson, quien fue el botánico y naturalista, acompañante de Cook en su viaje anterior al Pacífico, se encontraba interesado en que finalmente descubrió uno de estos especímenes en 1788.

Charles Louis L'Héritier de Brutelle, magistrado de profesión aristócrata del partidario de la Revolución Francesa y botánico autodidacta con especial interés por los árboles, durante su visita a Londres en 1786 – 1787, trabajó en el herbario que conservaba Banks, L'Héritier reconoció y describió por primera vez a los árboles de goma, los llamó eucaliptos, de las antiguas palabras griegas “*eu*” (bien o muy) y “*kalypto*” (cubierto o escondido) por la estructura de sus flores (Silva y Fernández, 2015, p.03).

2.6.3 Taxonomía

Tabla 3-2: Taxonomía del Eucalipto.

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
FAMILIA	<i>Myrtaceae</i>
GÉNERO	<i>Eucalyptus</i>

Fuente: García, 2014, p.01.

Realizado por: Romero, 2023.

Desde que L' Heritier puso el nombre al género muchas otras especies han sido descritas y se han propuesto diversas clasificaciones taxonómicas, sin embargo, los eucaliptos, además de su variedad de tamaños, presentan una muy amplia gama de características morfológicas en flores y frutos, hojas y corteza, razón por la que no siempre existe consenso entre los botánicos (Barros, 2012, p.78).

Barros (2012, p.78) señala que en 1971 Pryor y Johnson realizaron una clasificación de todos los eucaliptos conocidos, separándolos en siete grandes grupos (subgéneros) sobre la base de la asociación de numerosos caracteres morfológicos, sistema que ha sido revisado posteriormente por el mismo Johnson y otros especialistas, más tarde en 1979 efectuaron un completo análisis de la familia *Myrtaceae* en todos sus géneros sobre la base de la estructura floral. En 1988, Chippendale clasificó 513 especies y las ordenó en 92 series. Brooker en el año 2000, divulgó una clasificación formal que incluyó a todos los Eucaliptos conocidos hasta este actual momento, reconociendo únicamente al género *Eucalyptus* y trece subgéneros dentro de este. Las siguientes características describen de manera universal al género:

Tabla 4-2: Caracterización botánica del género *Eucalyptus*.

Partes	Descripción
Corteza	Es un carácter morfológico muy importante en la identificación de los Eucaliptos, se distingue entre la corteza de los árboles jóvenes y la de los adultos; las cortezas de los árboles jóvenes por lo general no están bien formadas y cambiará con el paso del tiempo, las cortezas se pueden distinguir por su superficie (lisa o rugosa), por su duración (persistente o caediza) y también por el color.
Hojas	Atraviesan diversas fases: plántula, juvenil, intermedia y adulta. Las hojas juveniles son: sésiles y opuestas, glaucas, de ovadas a lanceoladas anchas; y

	las hojas adultas son: pecioladas y alternas, lanceoladas, péndulas, raramente erectas. En las hojas adultas es más notoria su nervadura, presentan: un nervio central y secundarios pinnados que suelen soldarse en una línea próxima al margen.
Infloriscencia	Los eucaliptos pueden presentar flores agrupadas en umbelas, panículas o corimbos terminales. Las umbelas suelen localizarse en las axilas de las hojas y pueden aparecer solitarias o en pares; las panículas o corimbos suelen ser terminales, pero también pueden ser axilares. En el caso de las umbelas pueden aparecer de tres flores o de más de tres, lo que constituye un carácter de diferenciación. Lo más importante de los botones florales para la identificación de este género es la forma del opérculo, su longitud y su anchura.
Fruto	Fruto en cápsula, generalmente con hipanto leñoso, loculicida dehiscencia por valvas apicales.
Semilla	Bastantes numerosas y pequeñas, con diferentes formas y colores.

Fuente: Fernández y Silva, 2016, p.28-30.

Realizado por: Romero, 2023.

2.6.4 Eucaliptos en Ecuador

Luzar (2007, p.85), considera que los cambios geológicos se deben a la dinámica del suelo, atribuyendo la conversión de diferentes cubiertas terrestres en plantaciones de rápido crecimiento como el Eucalipto, varias especies del género *Eucalyptus* son originarias de Australia y se introdujeron en diferentes partes del mundo a finales del siglo XVIII. Consecutivamente, se incrementaron las plantaciones de *Eucalyptus* a gran escala mundial, debido a la creciente necesidad para las industrias en la transformación de la madera y el sector de la construcción (Tesfaw et al., 2023, p.01).

El Comercio (2017: 1A), informa que, en el Ecuador esta especie arbórea predomina diversos paisajes ecuatorianos, especialmente los de la Sierra; cabe recalca que este género se introdujo desde 1 860 en el gobierno de Gabriel García Moreno; las plantaciones se produjeron por dos razones: la aridez que presentaban algunos parajes de la Sierra ecuatoriana y por el uso de la madera como energía al emprendimiento de la época para la construcción del tren entre Quito y Guayaquil.

En Ecuador estos árboles se encuentran distribuidos en las provincias de la Sierra, tienen mayor representación en: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja (El Comercio, 2017: 1A).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Caracterización del lugar

3.1.1 Área de estudio

En el año 2 022 se recolectaron muestras entomológicas en diferentes meses del año dando origen a dos colectas, en agosto la primera colecta y en septiembre la segunda colecta, realizadas en las plantaciones del sector norte de la empresa Novopan del Ecuador S.A., provincia de Imbabura en dos haciendas: “Pisangacho” cantón San Miguel de Urcuquí y “La Magdalena” cantón Ibarra.

3.1.2 Ubicación geográfica de la zona de estudio

Tabla 1-3: Ubicación geográfica de dos haciendas de la empresa Novopan del Ecuador S.A.

HACIENDAS	Latitud	Longitud	Altitud
Pisangacho	0°25'13"N	78°11'50"O	2 320 m.s.n.m.
La Magdalena	0°15'0" N	78°4'60"O	2 861 m.s.n.m.

Fuente: Google EARTH, 2022.

Realizado por: Romero, 2022.

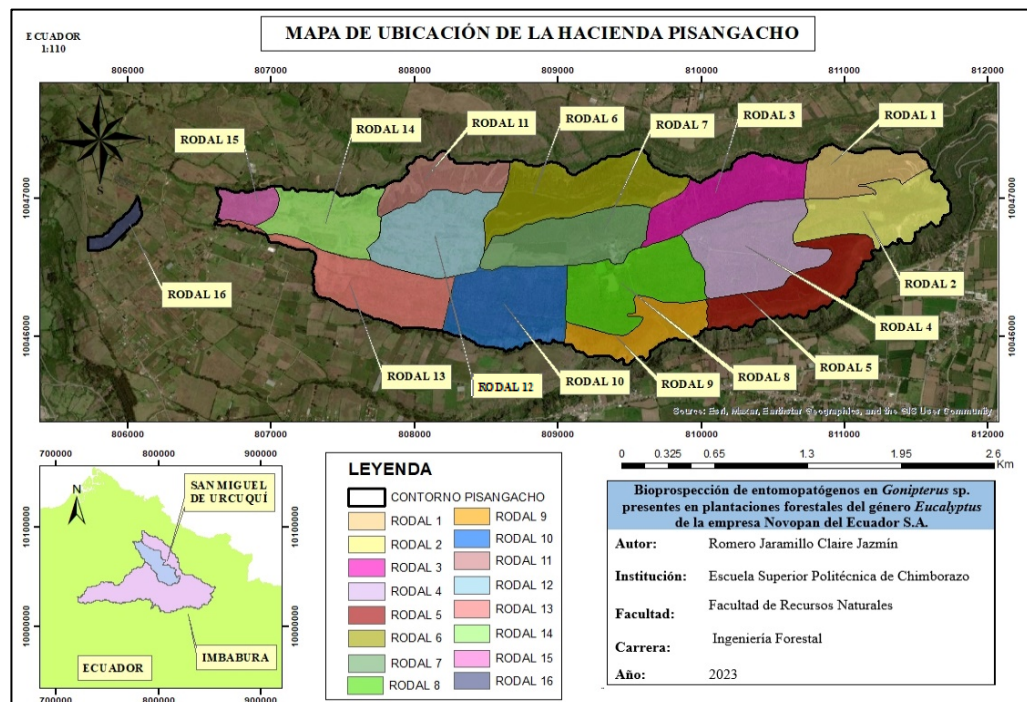


Ilustración 1-3: Rodales de la hacienda “Pisangacho”.

Realizado por: Romero, 2023.

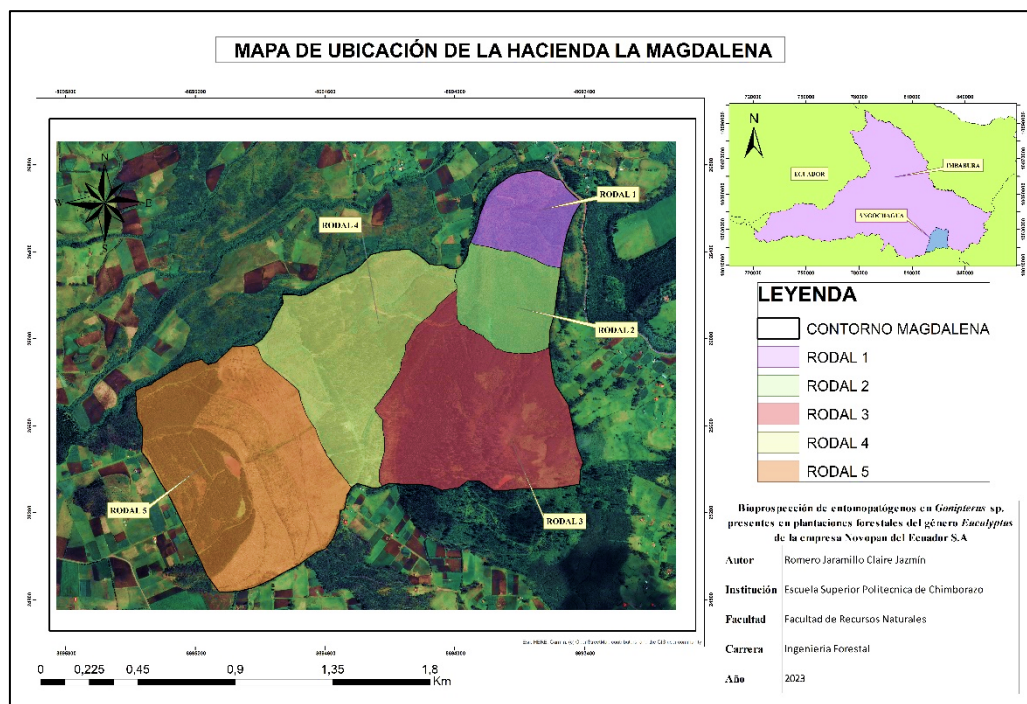


Ilustración 2-3: Rodales de la hacienda “La Magdalena”.

Realizado por: Romero, 2023.

3.1.3 Condiciones climáticas

Tabla 2-3: Condiciones climáticas de las dos haciendas de la empresa Novopan del Ecuador S.A. ubicadas en la provincia de Imbabura.

HACIENDAS	Temperatura promedio °C	Humedad relativa %	Precipitación anual mm
Pisangacho	14 - 19	50	500 – 15 500
La Magdalena	10 - 16	68	700 – 1 500

Fuente: INAMHI, 2018.

Realizado por: Romero, 2022.

3.1.4 Selección de las zonas del muestreo

En el presente Trabajo de Investigación Curricular se planteó para cada rodal de las haciendas “Pisangacho” y “La Magdalena” un muestreo aleatorio en el cual la población se seleccionó de manera fortuita simple o al azar, donde cada individuo tiene la misma probabilidad de ser seleccionado.

3.1.5 Localización del laboratorio

El aislamiento de los potenciales hongos entomopatógenos de las dos haciendas ubicadas en la provincia de Imbabura, se realizó en el laboratorio de “Fitopatología”, de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Politécnica Superior del Chimborazo, situada en la Panamericana Sur km 1 ^{1/2}, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador.

Tabla 3-3: Ubicación geográfica del laboratorio de Fitopatología.

LABORATORIO	Latitud	Longitud	Altitud
Fitopatología	01°38'51"N	78°40'59"O	2 850 m.s.n.m.

Fuente: Google EARTH, 2022.

Realizado por: Romero, 2022.

3.2 Equipos y materiales

3.2.1 Equipo para el muestreo en campo

Laptop, cámara fotográfica y GPS.

3.2.2 Materiales para el muestreo en campo

Microtubos Eppendorf de 2 mL, frascos para muestras, gel para hielo, cooler, marcador permanente, papel calco, libreta para apuntes, esferos, lápiz, borrador y tijera, cuerda, tijeretas.

3.2.3 Equipo para laboratorio

Cámara de flujo laminar (OASIS 48), balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), secador de vidrio (SELECTA 200038), microondas (PANASONIC 900W), cámara fotográfica (CANNON), micropipeta (Eppendorf), autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), destilador de agua (BOECO WS 8000), incubadora (J.P. SELECTA 2001249, FISHER), refrigeradora (Durex), agitador magnético (STABLE TEMP 03407-00), vortex (QILINBEIER QL-901), bioespectrofotómetro (EPPENDORF Basic), cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710), calibrador digital (VERNIER), cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC1500IIA2-X), incubadora (MEMMERT UN 30), mechero de Bunsen, termobloque (HM100-PRO), centrifuga (EPPENDORF 5424), ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450), destilador de agua (BOECO WS 8000), microondas (Panasonic 900w), fuente de poder para electroforesis (FISHER

SCIENTIFIC FB300), termociclador (EPPENDORF Vapo.protect), transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A).

3.2.4 Materiales para laboratorio

Mascarilla, guantes de nitrilo, papel toalla, papel periódico, papel aluminio, cinta masking, cajas Petri (90 mm), papel film, jeringas (5 ml), botellas de vidrio de tapa roscable (500 mL y 100 mL), sorbetes y palillos, microtubos Eppendorf (2 mL, 1,5 mL y 200 μ L), morteros y pistilos, puntas para micropipeta (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L), gradilla para puntas azules, placas porta objetos, placas cubre-objetos, cajas cubre-objetos, cajas para guardar porta-objetos, marcador de peso molecular, enzima PCR (Master Mix), probeta (100 mL y 1000 mL), micropipeta (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L), vasos de precipitación (50 mL y 100 mL), matraz Erlenmeyer (250 mL), cucharas desechables.

3.2.5 Reactivos e insumos

Agua destilada estéril, nitrógeno líquido, Papa Dextrosa Agar al 3,9 % (PDA DifcoTM), antibiótico Chloramphenicol a 50.000 rpm, antibiótico Streptomycin a 10.000 rpm, Master Mix, 2X (Go Taq[®] Hot Star Green), primers RAPDs, agua ultrapura, kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard[®] Genomic DNA), cloroformo alcohol isoamílico (24:1), isopropanol frío, etanol, Nuclei Acid Staining Solution (UniSafe Dye), Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA), 10X BlueJuiceTM Gel Loading Buffer (Invitrogen), DNA Ladder Bench Top 100 kb (PROMEGA).

3.2.3 Material biológico

Muestras entomológicas de la plaga *Gonipterus* sp. en estadio larval y adultez, 13 larvas y 8 adultos. Hongos aislados potenciales entomopatógenos: *Fusarium* sp., *Beauveria bassiana*, *Epicoccum nigrus* y *Alternaria arborescens*.

3.3 Metodología

3.3.1 Obtención de muestras entomológicas de dos haciendas “Pisangacho” y “La Magdalena” provincia Imbabura.

Las muestras de la plaga reconocida como *Gonipterus* sp. fueron obtenidas dentro de las plantaciones de Eucalipto establecidas en la empresa Novopan del Ecuador S.A., situadas en los

cantones: San Miguel de Urcuquí parroquia Urcuquí e Ibarra parroquia Angochahua, provincia de Imbabura. Para la selección del muestreo se tuvo en cuenta los estadios del insecto: larvas y adultos, con presencia de micelio o sintomatología provocada por algún patógeno.

Para identificar a la plaga se siguió las descripciones fundamentadas por Loch, tanto las larvas como los adultos de esta especie son parásitos que se alimentan de las yemas, brotes y hojas nuevas del género *Eucalyptus*. Los adultos son de color castaño rojizo hasta café grisáceo, según su edad; sus élitros presentaban bandas claras y medían aproximadamente 1 o 1,5 mm. Las larvas presentaron colores amarillentos verdosos, fueron ápodas de 1,5 mm de largo y de dorso cubierto con bandas claras. Los huevos fueron amarillentos y alargados de 2 mm (Gumovsky et al., 2015, p.577).

3.3.2 Aislamiento por diluciones seriadas de entomopatógenos en *Gonipterus* sp.

Se efectuó la metodología puntualizada por Sanz (2011, pp.22-23) con algunas modificaciones para el aislamiento partiendo del lavado de los insectos recolectados y posterior siembra en medio de cultivo PDA mediante diluciones seriadas y extensión en placa.

Al igual que el anterior aislamiento se realizó en la cabina de flujo laminar, se tomaron las muestras entomológicas de mayor interés a estudiar y estas fueron introducida en microtubos de 2 mL con solución salina (0,85 %). A continuación, los microtubos fueron colocados en una microcentrífuga (EPPENDORF 5424) y estos fueron centrifugados a 5 000 rpm por 2 minutos. Luego se tomó de cada tubo 50 μ L y se depositó esta alícuota en cajas Petri con medio de cultivo PDA extendiendo la alícuota colocada con el asa Digralsky e incubando las cajas de manera invertida a 26 °C en condiciones de oscuridad por 15 días.

3.3.2.1 Cálculo de UFC en diluciones seriadas

Para la determinación de la diversidad se estimó la abundancia de hongos crecidos en cada una de las cajas sembradas por cada una de las metodologías anteriormente citadas, para este se realizó el conteo de las colonias llevando un registro cada dos días del crecimiento y avance de la morfología de las tres repeticiones de las diluciones seriadas, tanto de la solución madre como de la dilución 10^{-1} . Una vez separados los resultados se procedió a ordenar desde la mayor cantidad de morfotipos hasta la menor cantidad de morfotipos. Ya ordenados estos valores se promedió a determinar el valor de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL de muestra = (número de colonias * factor de dilución) / mL) (Sanz, 2011, pp.23-24).

3.3.2.2 *Índice de diversidad en diluciones seriadas*

Los análisis de diversidad para morfotipos por diluciones seriadas fueron calculados con los Índices de Diversidad. Para la diversidad Alfa que existe dentro de cada muestra se usó la serie de Hill, que lleva en consideración el número efectivo de OTUs para calcular la riqueza de especies ($q=0$), diversidad de Shannon ($q=1$) y la diversidad de Simpson ($q=2$) acompañada de la librería iNEXT en el programa R versión 4.3.0. La diversidad de morfotipos entre diluciones seriadas de los rodales de la hacienda Pisangacho fueron analizados posteriormente con estadística descriptiva, donde se utilizará descriptores como: media y mediana, estos datos se compararon con la estadística no paramétrica mediante la significancia del intervalo de confianza al 95 % (Sanmiguel, 2021, p.21).

3.3.3 *Aislamiento directo de entomopatógenos en *Gonipterus* sp.*

Se implementó la metodología clave descrita por Humber, con las siguientes modificaciones para el aislamiento directo de tejidos entomológicos (Hernández et al., 2011, pp.593-594).

El procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar (OASIS 48), la cual fue desinfectada previamente. Este aislamiento consistió en tomar al insecto con la ayuda de una pinza desinfectada con alcohol al 70 % y con palillos de dientes estériles, se tomó una pequeña porción de micelio del cuerpo del insecto y se colocó en una caja Petri con medio estéril Papa Dextrosa Agar al 3,9 % (PDA Difco™), incubándose a 26 °C en condiciones de oscuridad por 15 días.

3.3.3.1 *Cultivos puros*

Para la obtención de cultivos puros, se usó dos técnicas similares:

La primera consistió en el uso de sorbetes esterilizados con los cuales pequeños discos de micelio fueron trasladados en nuevas cajas Petri con medio de cultivo PDA. La segunda técnica consistió en raspar partes de la muestra con micelio y con palillos trasladar pequeñas porciones del micelio del hongo en un nuevo medio de cultivo PDA. Posteriormente los nuevos cultivos fueron incubados a una temperatura de 26 °C durante 15 días, en posición invertida y en condiciones de oscuridad.

3.3.3.2 Conservación de los hongos obtenidos

Se utilizó la metodología propuesta por Castellani, con ciertas modificaciones citadas por Fernández et al., (2013, p.363), con ayuda de sorbetes esterilizados se fragmentaron pequeños cortes de discos de micelio del cultivo de aproximadamente 5 mm de diámetro, seguido de esto con ayuda de palillos esterilizados fueron trasladados a microtubos estériles de 1,5 mL y finalmente llevados a refrigeración a una temperatura de 5 °C.

3.3.4 Caracterización cultural

La siguiente tabla detalla las características culturales a considerarse para la caracterización colonial y la pigmentación del lado adverso y reverso de los potenciales hongos entomopatógenos aislados. Para la coloración de los hongos fúngicos se consideró la paleta Pantone.

Tabla 4-3: Características culturales.

Características de la colonia	Forma: circular, irregular, filamentosa.
	Elevación: plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada.
	Margen: entero, lobulado, desflecado, rizoide.
	Superficie: plegada, con surcos radiados, cerebriforme.
Pigmentación en el lado anverso y reverso de la colonia.	Textura: granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.
	Tamaño: crecimiento limitado o crecimiento invasivo.

Fuente: Pinto, 2017, p.08.

Realizado por: Romero, 2023.

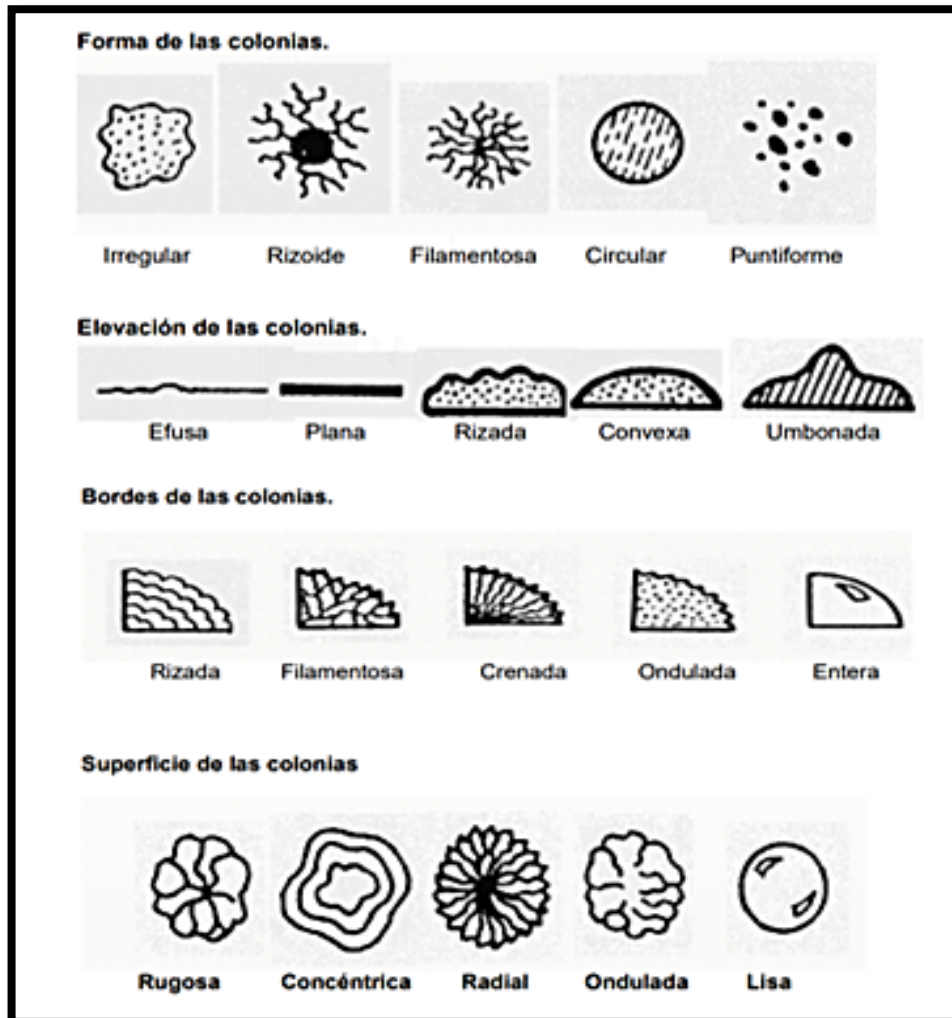


Ilustración 3-3: Características culturales de las colonias.

Realizado por: Romero, 2023.

3.3.5 Caracterización morfológica

3.3.5.1 Método con la cinta adhesiva

Se utilizó la metodología propuesta por Franco (2015, p.07), con las siguientes modificaciones:

Se colocó una gota de lactoglicerol sobre una placa portaobjetos, seguido de este paso se adhirió la cinta adhesiva transparente sobre la colonia del hongo en crecimiento activo obteniendo una pequeña porción de micelio y estructuras, luego se colocó la cinta sobre la placa portaobjetos con cuidado para evitar la formación de burbujas.

3.3.5.2 Método con aguja de disección

Otra técnica para la caracterización morfológica se basa en la metodología de Solé (2004, p.34) con ciertos ajustes:

Luego de preparar lactoglicerol se vierte una gota sobre el portaobjetos, con agujas de disección estériles se toma una porción del micelio esparciéndolo sobre la gota de lactoglicerol, luego con un cubreobjetos cubrir sutilmente la muestra para evitar formación de burbujas de aire.

3.3.6 Caracterización molecular

La caracterización molecular consistió de extracción de ADN, reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis, secuenciación y análisis de las muestras secuenciadas.

3.3.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN tuvo los siguientes pasos: Lisis, precipitación de proteínas, clarificación, precipitación de ADN, lavado, elución de ADN y control de calidad.

Se utilizó el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation), con pertinentes alteraciones establecidas por el protocolo del laboratorio:

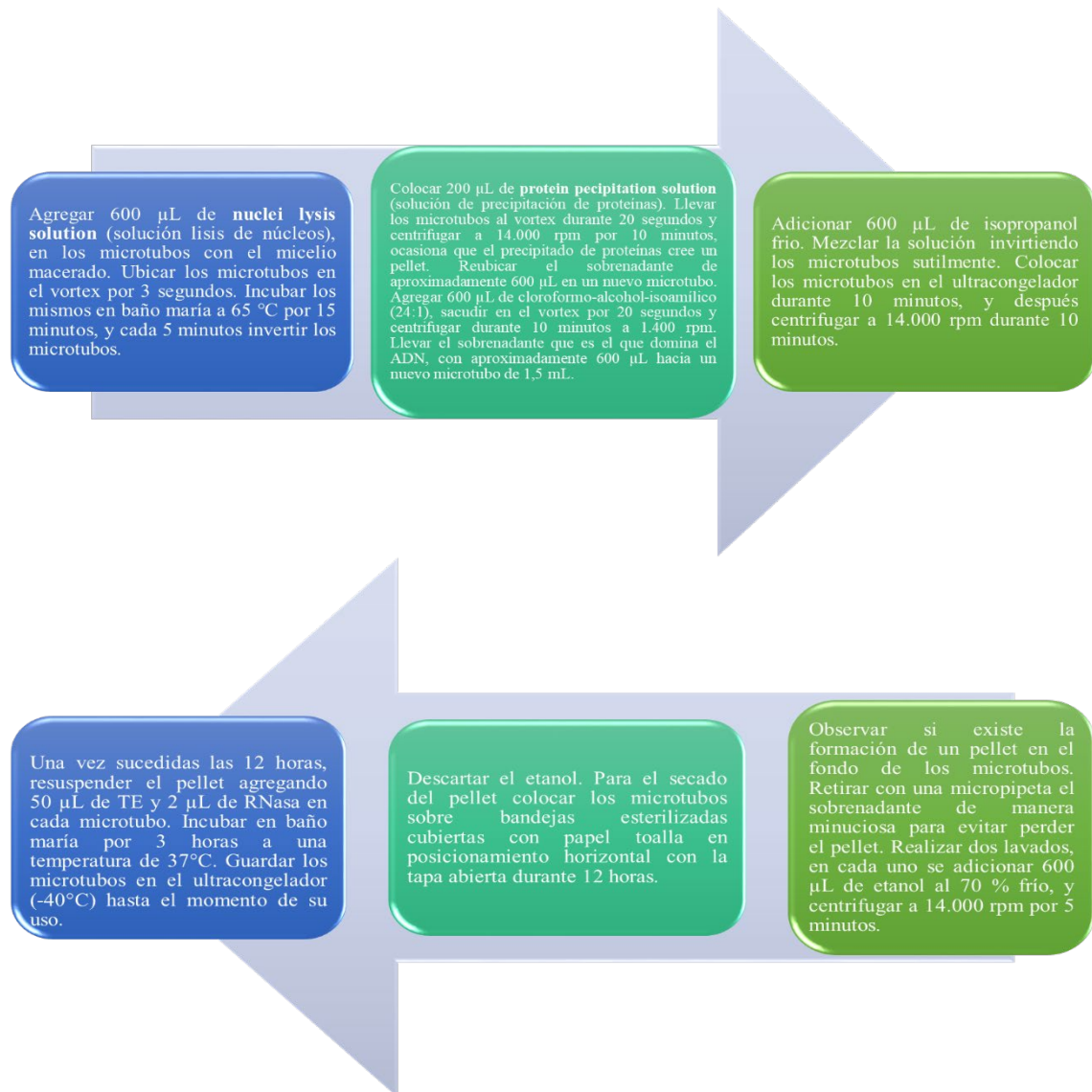


Ilustración 4-3: Esquema de la extracción de ADN.

Realizado por: Romero, 2023.

3.3.6.2 Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se la realiza en dos partes, realizando la mezcla de reacción y colocando las reacciones de PCR en un termociclador con un perfil térmico.

Mezcla de reacción de PCR:

Se usó 12,5 µL de Master Mix, 2X Go Taq® Green; 2 µL (1 pmol) primer Forward (ITS 1); 2 µL (1 pmol) primer Reverse (ITS 4); 4,5 µL de agua ultrapura estéril; 4 µL (ng / µL) de ADN. Dando un volumen total de 25 µL. Se usaron los iniciadores ITS₁ e ITS₄ (**Tabla 5-3**), para la caracterización molecular de los morfotipos encontrados.

Tabla 5-3. Primers usados para las PCR.

Código	Secuencia
ITS ₁ F (Forward)	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA- 3'
ITS ₄ R (Reverse)	3'-TCCTCCGTTATTGATATGC- 5'

Fuente: Op de Beeck. et al., 2014, p.03.

Realizado por: Romero, 2023.

Perfil térmico:

En el programa usado para la amplificación por PCR, la desnaturalización inicial usada fue de 95 °C durante 5 minutos y 40 ciclos de 95 °C por 60 segundos (desnaturalización), 51 a 54 °C durante 60 segundos (acoplamiento de los primers), 72 °C por 60 segundos (extensión) y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 5 minutos en el termociclador.

3.3.6.3 Electroforesis

En este proceso se verificó si existió amplificación de los productos de PCR. El gel de la electroforesis se preparó con 0,6 g agarosa y 60 mL de Buffer Tris Borato EDTA (TBE), a esta preparación se le adicionó 2,5 µL del agente intercalante (Diamond™ Nucleic Acid Dye), se le colocó al gel en la cuba electroforesis y rápidamente se añadieron los peines para establecer los pocillos, una vez gelificado el gel se retiró los peines y se los aumentó a la cuba a un volumen de 300 mL aproximadamente de TBE a una concentración del 1X.

En una cinta parafilm se colocaron 1,5 µL de buffer de carga (Blue/Orange 6X Loading Dye) y 2,5 µL de los productos de PCR, las muestras fueron instaladas en los pocillos y se corrió la electroforesis con un voltaje de 80 voltios durante 60 minutos, terminada la electroforesis el gel fue colocado sobre el transluminador UV y fue observado si ocurrió la amplificación de los productos de la PCR.

3.3.6.4 *Secuenciación*

Las muestras fueron enviadas para el secuenciamiento en la empresa MACROGEN COREA, con la tecnología SANGER.

3.3.6.5 *Análisis de las muestras secuenciadas*

En el programa Chromas versión 2.6.6., fueron observados los cromatogramas de las muestras amplificadas. Se suprimió las partes ruidosas o de mala calidad de las secuencias y fueron exportadas con formato FASTA. Estas secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la herramienta BLAST en el GENBANK del NCBI (National Center for Biotechnology Information), determinando la identificación de los hongos con los parámetros porcentaje de identidad, porcentaje de cobertura y e-value.

3.3.6.6 *Abundancia relativa a nivel de filo, clase, orden, familia y género en relación a cuatro rodales*

Siguiendo la metodología establecida por Sanmiguel (2021, p.21) con mínimas modificaciones, las cepas caracterizadas: culturalmente, morfológicamente y molecularmente fueron utilizados para el análisis de diversidad fúngica asociada a posibles hongos entomopatógenos en *Gonipterus* sp. y los datos se compararon mediante gráficos de barras plasmados por la herramienta estadística Microsoft Excel 2016.

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Datos de las muestras a estudiar

4.1.1 Individuos parasitados en diferentes colectas y haciendas

Tabla 1-4: Individuos parasitados en colecta N°1.

Hacienda Pisangacho	Adultos: 1 con código (M33)
	Larvas: 4 con código (M34, M35, M53, M63)
Hacienda La Magdalena	Adultos: No se encontró individuos parasitados
	Larvas: No se encontró individuos parasitados

Realizado por: Romero, 2023.

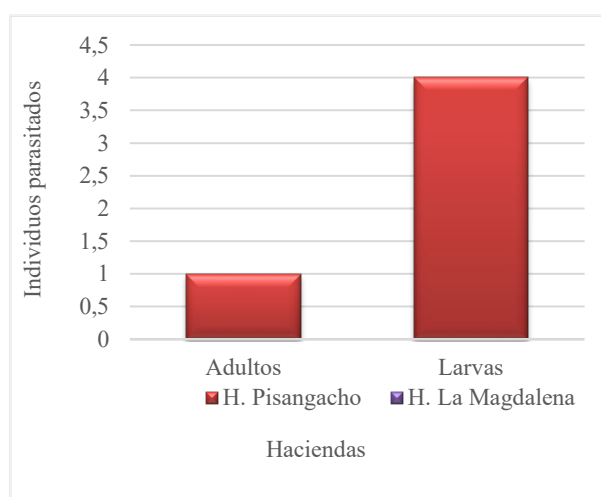


Ilustración 1-4: Número de individuos parasitados de la colecta N°1.

Realizado por: Romero, 2023.

En la colecta N°1 de las dos haciendas visitadas en el mes de agosto se encontró un total de 5 individuos parasitados (1 individuo en estadio adulto y 4 en estadio larval), únicamente se encontraron insectos parasitados en la hacienda Pisangacho, mientras que en hacienda La Magdalena solo se hallaron adultos y larvas sanas, los cuales no fueron considerados para este estudio. Estas muestras fueron utilizadas para realizar el método por aislamiento directo (**Tabla 1-4**) (**Ilustración 1-4**).

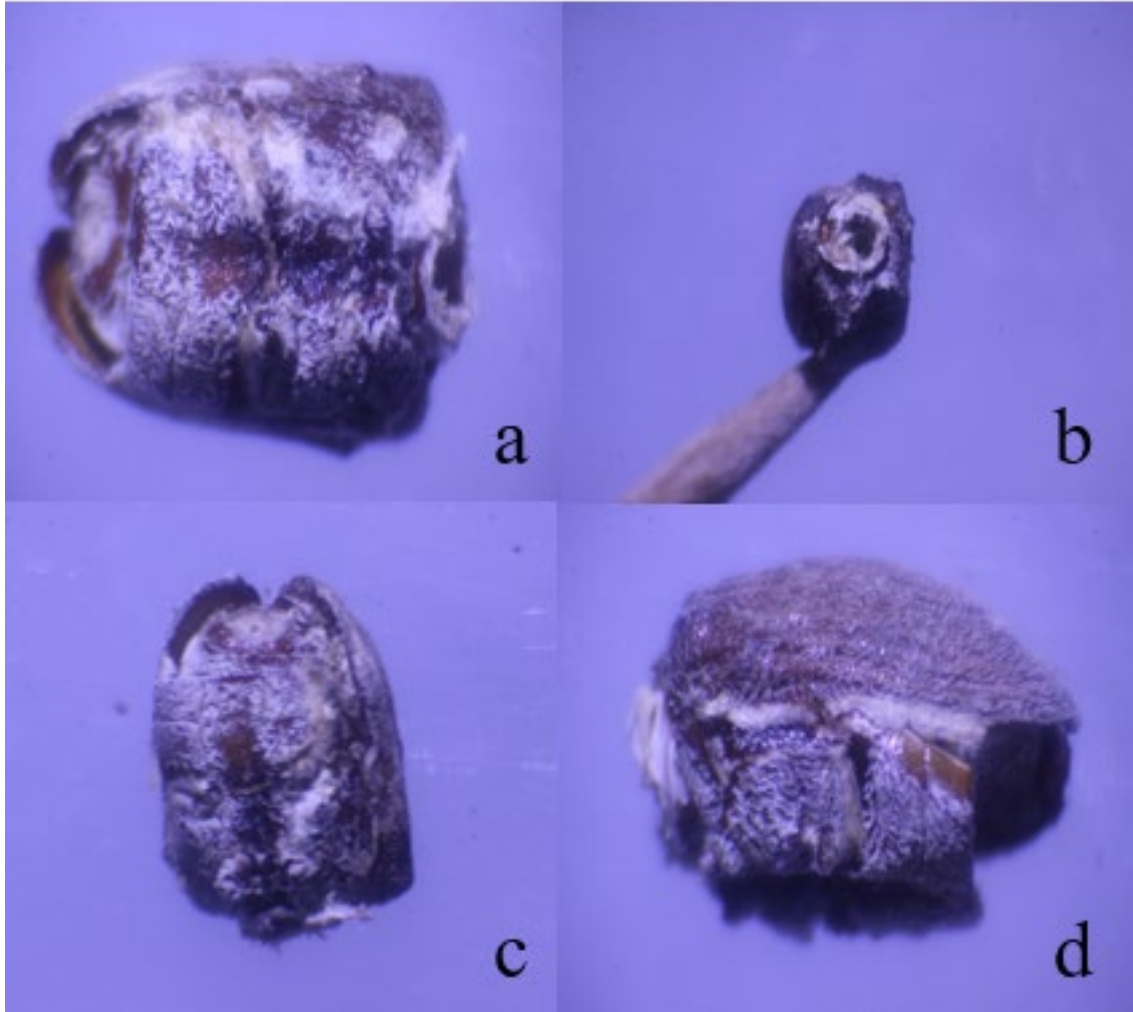


Ilustración 2-4: Adulto de *Gonipterus* sp. parasitado colectado (Código-M33). a) Vista posterior horizontal del cuerpo. b) Vista posterior de la cabeza. c) Vista posterior vertical del cuerpo. d) Vista lateral del cuerpo.

Realizado por: Romero, 2023.

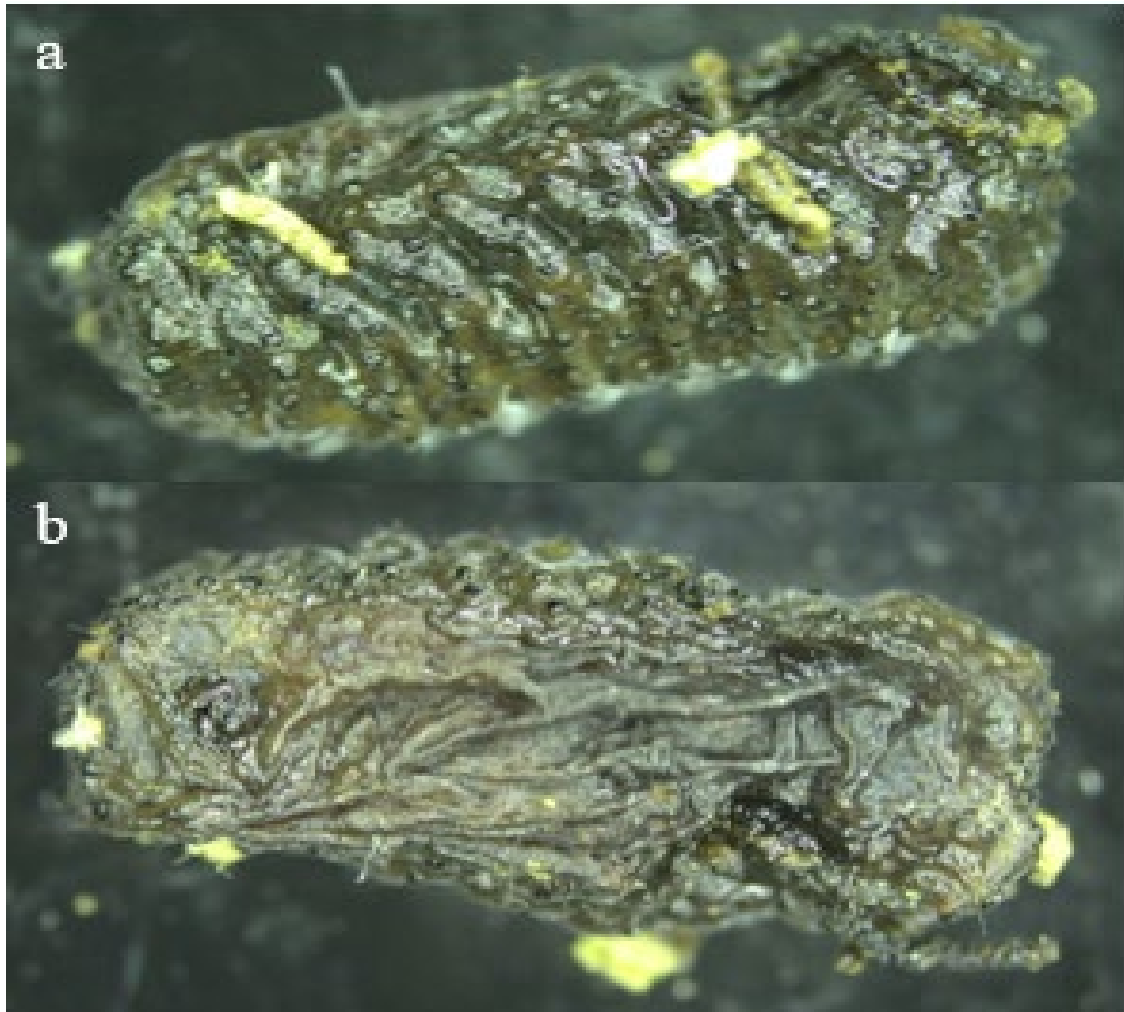


Ilustración 3-4: Larva en etapa final de *Gonipterus* sp. momificada colectada (Código-M53). a) Vista frontal horizontal. b) Vista posterior horizontal.

Realizado por: Romero, 2023.

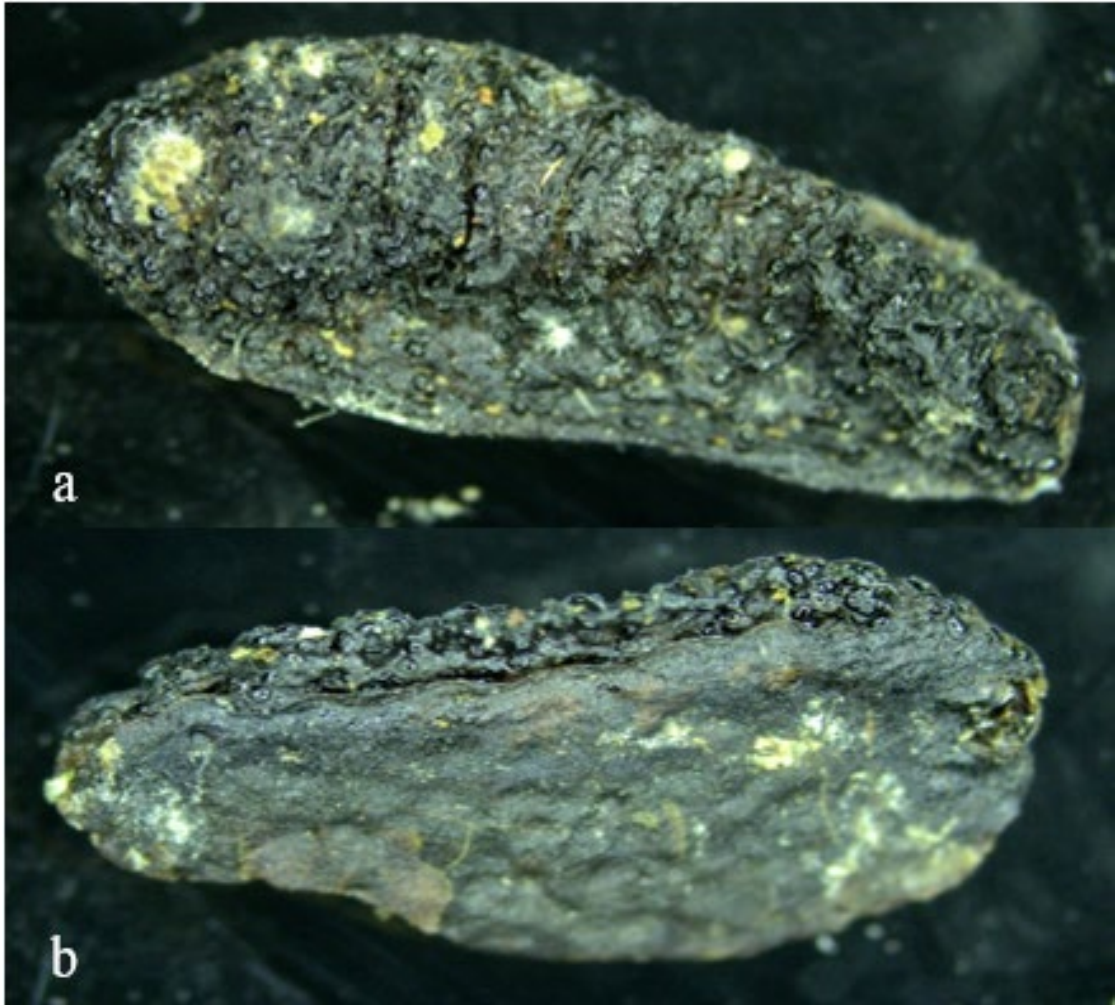


Ilustración 4-4: Larva en etapa final de *Gonipterus* sp. momificada colectada (Código-M63). a) Vista frontal horizontal. b) Vista posterior horizontal.

Realizado por: Romero, 2023.

Tabla 2-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°1 en la hacienda Pisangacho.

N° de rodal	Estadio (adulto/larva)	Código	Descripción del estadio	Edad de la plantación por rodal	Árboles por hectárea
7	Adulto	M33	Se encontró al primer adulto con abundante presencia de micelio (Ilustración 2-4).	10 – 11 años	41 063 arb/Ha
	Larva	M34	Larva en estado inicial con abundante presencia de micelio.	10 – 11 años	41 063 arb/Ha
	Larva	M35	Larva en estado final con poca presencia de micelio.	10 – 11 años	41 063 arb/Ha
12	Larva	M53	Larva en estado final momificada (Ilustración 3-4).	5 años	46 370 arb/Ha
4	Larva	M63	Larva en etapa indefinida momificada con micelio blanco (Ilustración 4-4).	10 años	51 715 arb/Ha

Realizado por: Romero, 2023.

Los individuos de la colecta N°1 en la hacienda Pisangacho presentaron una parasitación a simple vista (**Tabla 2-4**). La parasitación en los diferentes estadios del insecto plaga consistió desde micelio blanco en los adultos (**Ilustración 2-4**) hasta momificación en las larvas de etapa inicial y final (**Ilustración 3-4**) (**Ilustración 4-4**).

Tabla 3-4: Individuos parasitados en colecta N°2.

Hacienda Pisangacho	Adultos: 3 con código (M84, M85, M86)
	Larvas: 3 con código (M51, M55, M57)
Hacienda La Magdalena	Adultos: No se encontró muestras con presencia de micelio
	Larvas: No se encontró muestras con presencia de micelio

Realizado por: Romero, 2023.

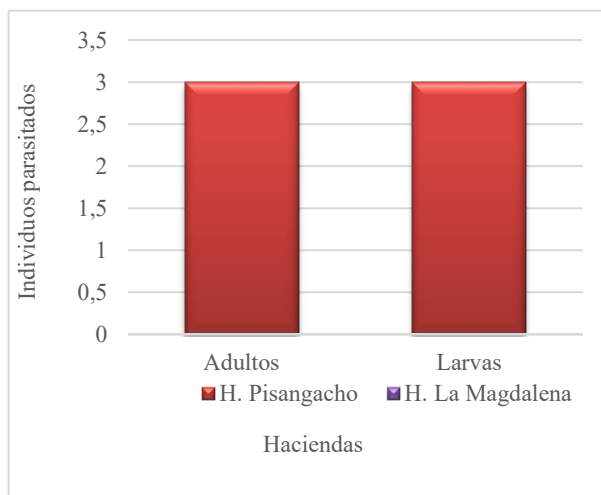


Ilustración 5-4: Número de individuos parasitados de la colecta N°2.

Realizado por: Romero, 2023.

En la colecta N°2 de las dos haciendas visitadas en el mes de septiembre se encontró un total de 6 individuos parasitados (3 individuos en estadio adultez y 3 en estadio larval), únicamente se encontraron insectos parasitados en la hacienda Pisangacho, mientras que en hacienda La Magdalena solo se hallaron adultos y larvas sanas, los cuales no fueron considerados para este estudio. Estas muestras fueron utilizadas para realizar el método de aislamiento por diluciones seriadas (Tabla 3-4) (Ilustración 5-4).

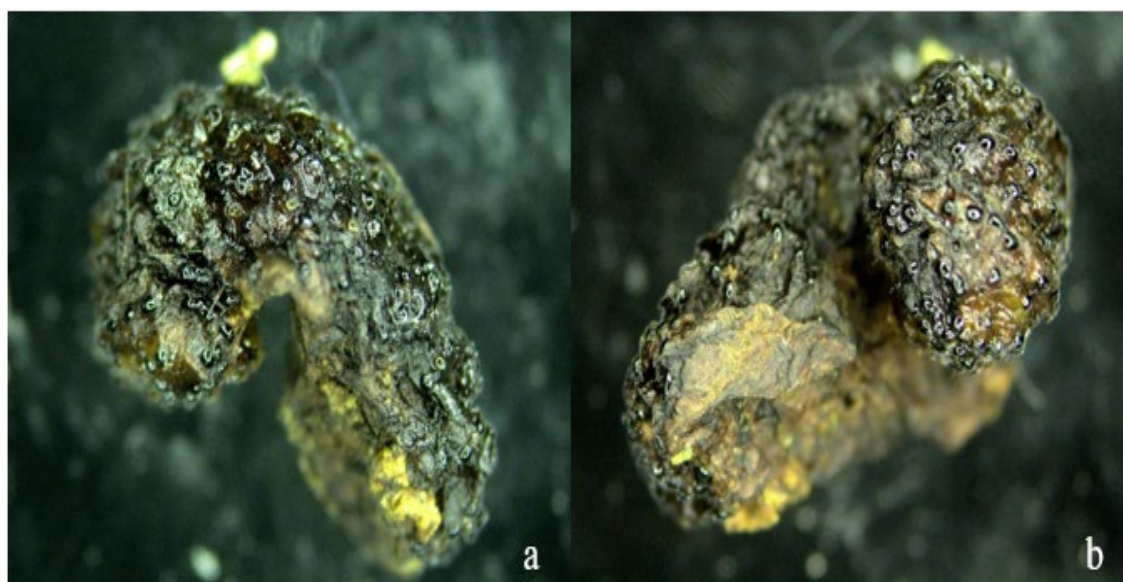


Ilustración 6-4: Larva en etapa indefinida de *Gonipterus* sp. momificada colectada (Código-M51). a) Vista frontal en posición diagonal. b) Vista posterior en posición diagonal.

Realizado por: Romero, 2023.

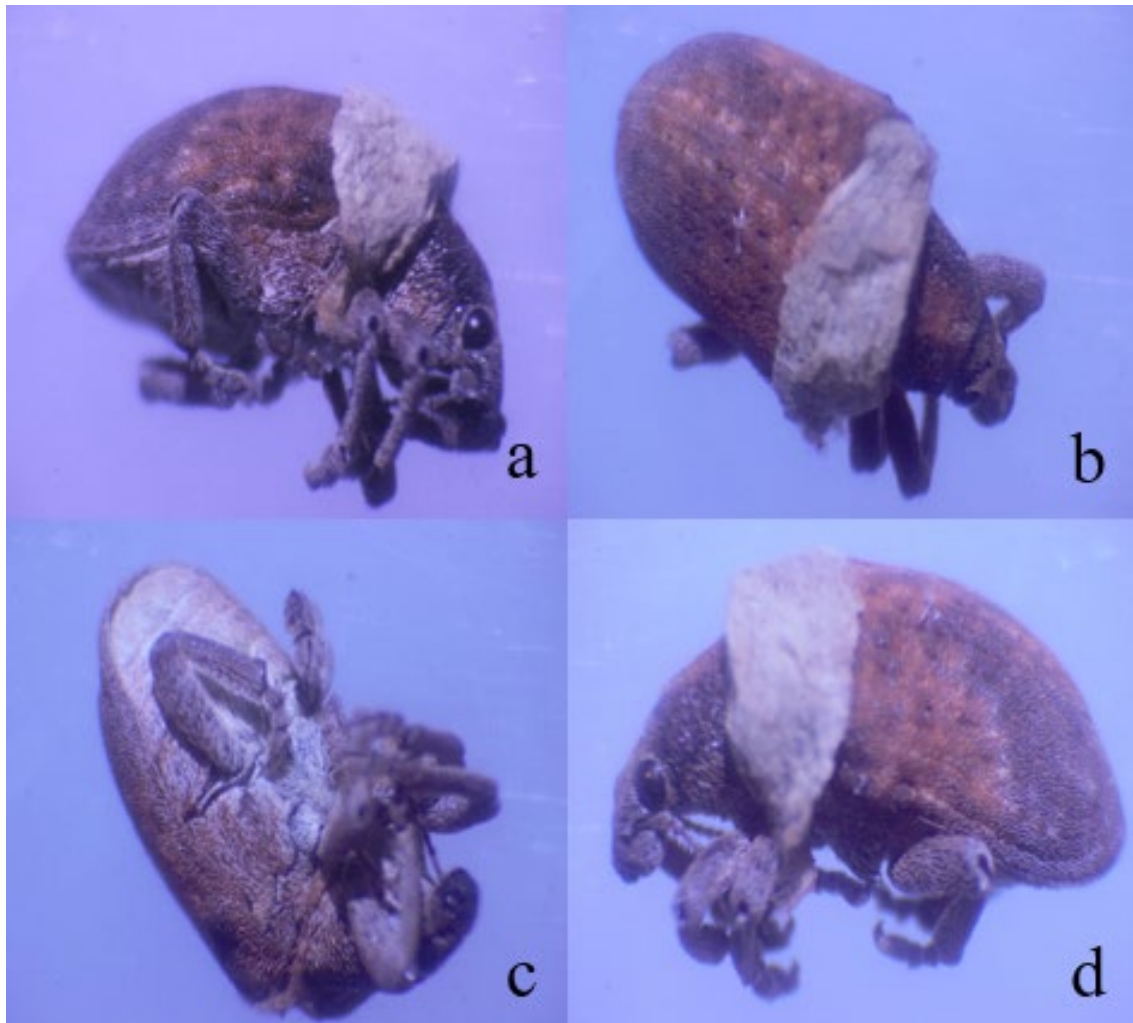


Ilustración 7-4: Adulto de *Gonipterus* sp. parasitado colectado (Código-M85). a) Vista lateral derecha. b) Vista frontal del cuerpo. c) Vista posterior del cuerpo. d) Vista lateral izquierda.

Realizado por: Romero, 2023.

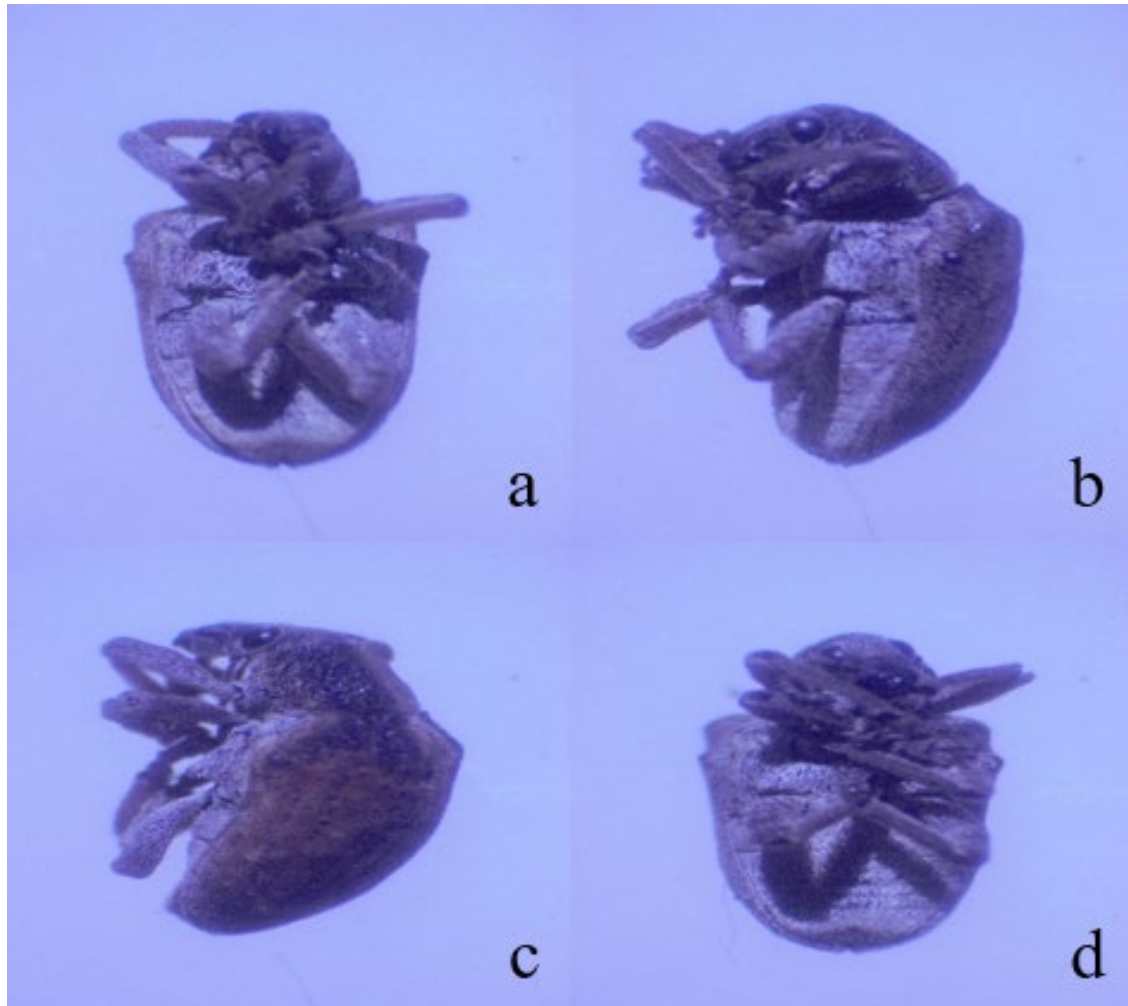


Ilustración 8-4: Adulto muerto de *Gonipterus* sp. parasitado colectado (Código-M86). a) Vista posterior del cuerpo. b) Vista lateral. c) Vista frontal del cuerpo. d) Vista posterior vertical.

Realizado por: Romero, 2023.

Tabla 4-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho.

N° de rodal	Estadio (adulto/larva)	Código	Descripción de la muestra	Edad de la plantación por rodal	Árboles por hectárea
10	Adulto	M84	Adulto muerto descompuesto.	10 – 11 años	49 278 arb/Ha
8	Adulto	M85	Adulto vivo con presencia de micelio blanco (Ilustración 7-4).	10 años	47 749 arb/Ha
	Adulto	M86	Adulto muerto con presencia de micelio blanco (Ilustración 8-4).	10 años	47 749 arb/Ha
12	Larva	M51	Larva en etapa indefinida momificada (Ilustración 6-4).	5 años	46 370 arb/Ha
	Larva	M55	Larva en etapa indefinida momificada con presencia de micelio.	5 años	46 370 arb/Ha
4	Larva	M67	Larva en etapa indefinida momificada con micelio verde.	10 años	51 715 arb/Ha

Realizado por: Romero, 2023.

Los individuos de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho presentaron una parasitación a simple vista (**Tabla 4-4**). La parasitación en los diferentes estadios del insecto plaga consistió desde micelio blanco en los adultos (**Ilustración 7-4**) (**Ilustración 8-4**) hasta momificación en las larvas de etapa inicial y final (**Ilustración 6-4**).

4.1.2 Individuos parasitados de diferentes colectas y haciendas

Tabla 5-4: Individuos parasitados en colecta N°1.

Hacienda Pisangacho	Adultos: No se consideró muestras para esta metodología
	Larvas: No se consideró muestras para esta metodología
Hacienda La Magdalena	Adultos: No se encontró muestras con presencia de micelio
	Larvas: No se encontró muestras con presencia de micelio

Realizado por: Romero, 2023.

Al encontrar pocas muestras con características patogénicas en la colecta N°1, no se consideró ninguna de estas muestras para utilizar en la metodología por diluciones seriadas. Sin embargo, las muestras de la colecta N°2 si fueron consideradas para esta metodología (**Tabla 5-4**).

Tabla 6-4: Individuos parasitados en colecta N°2.

Hacienda Pisangacho	Adultos: 4 con código (M84, M85, M86, M88) Larvas: 7 con código (M50, M54, M68, M72, M81, M87, M89)
Hacienda La Magdalena	Adultos: No se encontró muestras con presencia de micelio Larvas: No se encontró muestras con presencia de micelio

Realizado por: Romero, 2023.

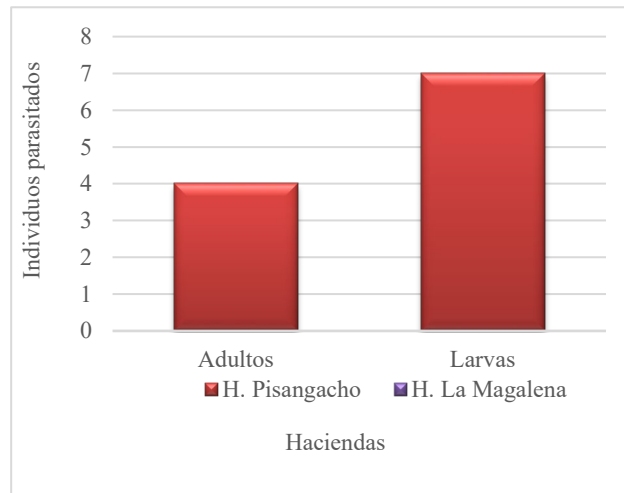


Ilustración 9-4: Número de individuos parasitados de la colecta N°2.

Realizado por: Romero, 2023.

En la colecta N°2 de las dos haciendas visitadas en el mes de septiembre se encontró un total de 11 individuos parasitados (4 individuos en estadio adultez y 7 en estadio larval), unicamente se encontraron insectos parasitados en la hacienda Pisangacho, mientras que en la hacienda La Magdalena solo se hallaron adultos y larvas sanas, los cuales no fueron considerados para este estudio. Estas muestras fueron utilizadas para realizar el método por diluciones seriadas (**Tabla 6-4**) (**Ilustración 9-4**).

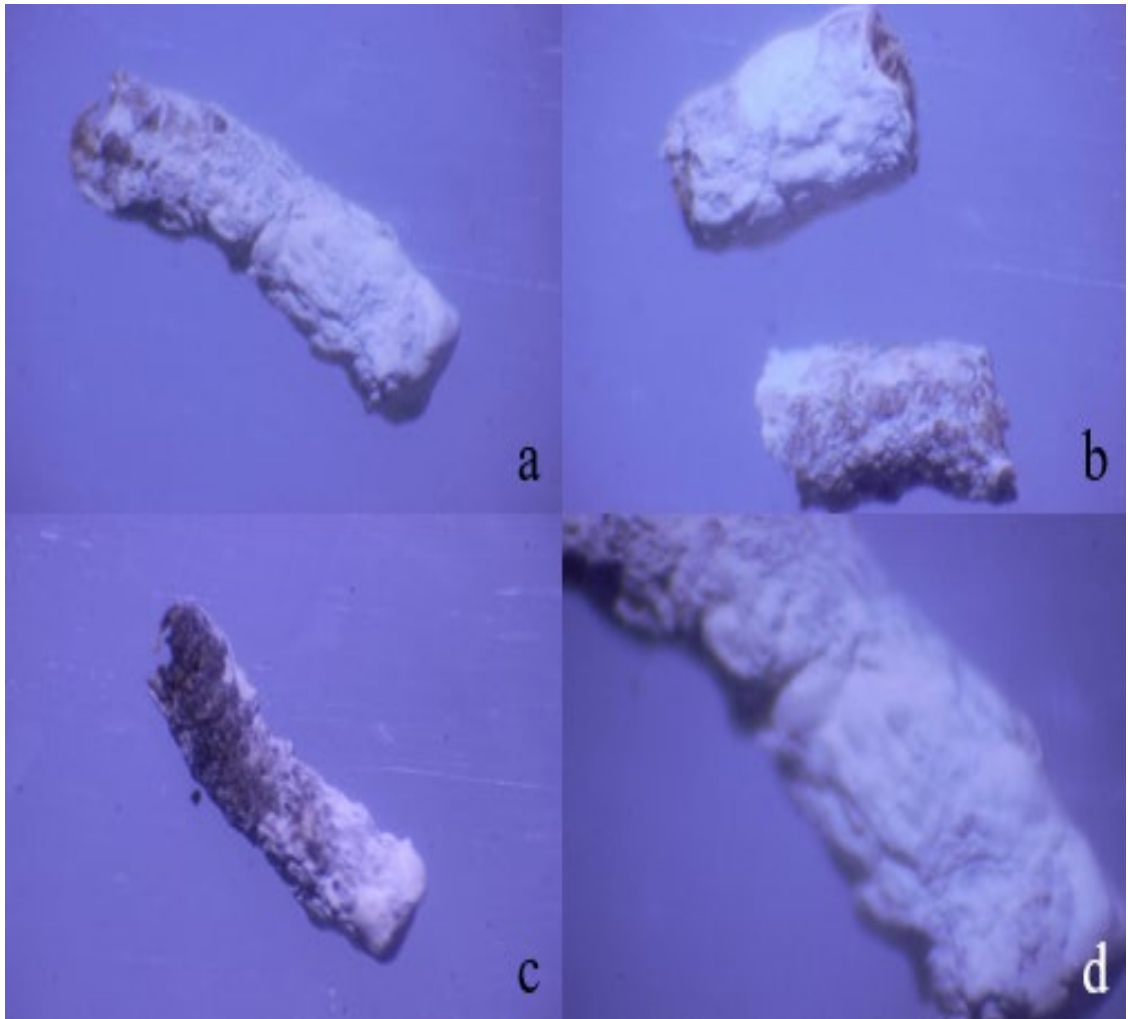


Ilustración 10-4: Larva en etapa inicial de *Gonipterus* sp. parasitada colectada (Código-M89). a) Vista lateral del cuerpo. b) Vista lateral fragmentada en dos. c) Vista frontal del cuerpo. d) Vista lateral en el lente de 40x.

Realizado por: Romero, 2023.

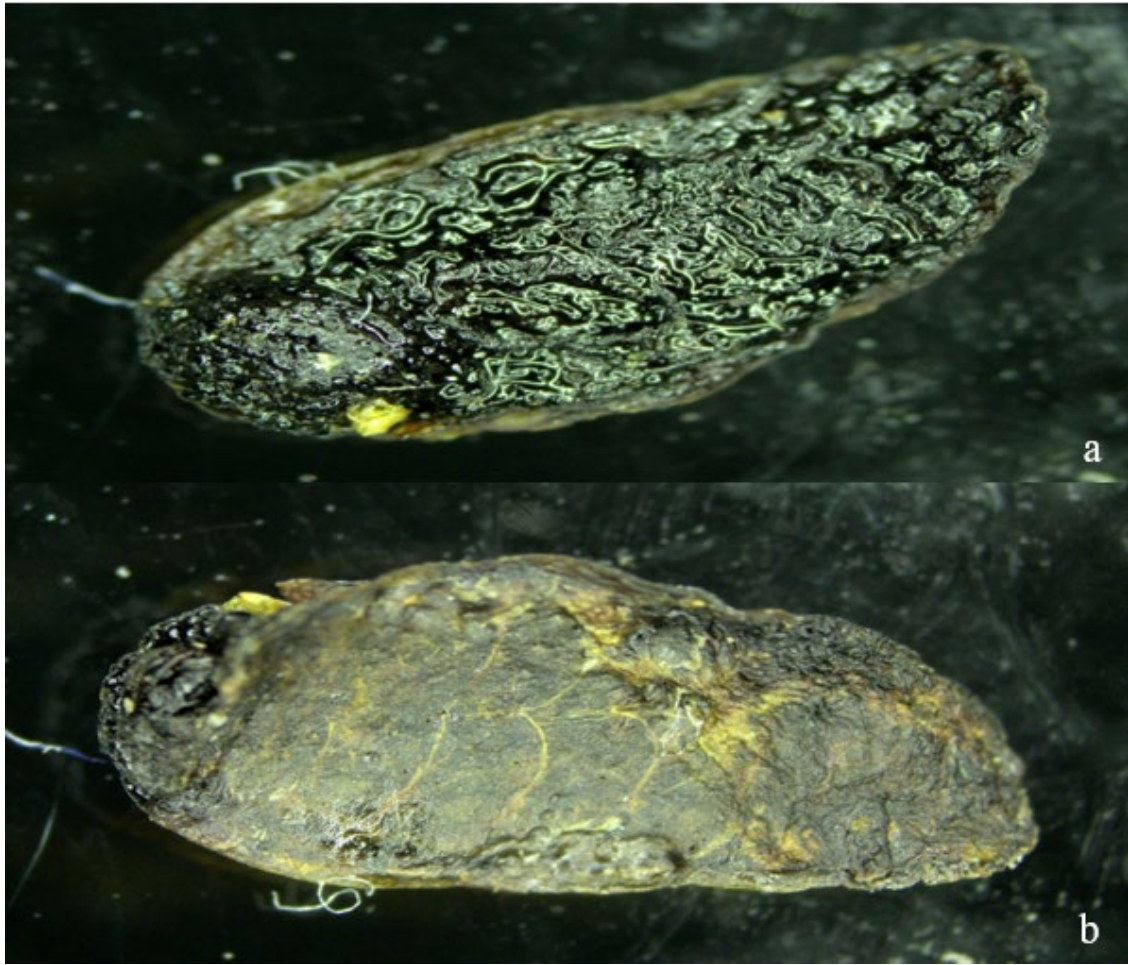


Ilustración 11-4: Larva en etapa final de *Gonipterus* sp. momificada colectada (Código-M54).

a) Vista frontal. b) Vista posterior.

Realizado por: Romero, 2023.

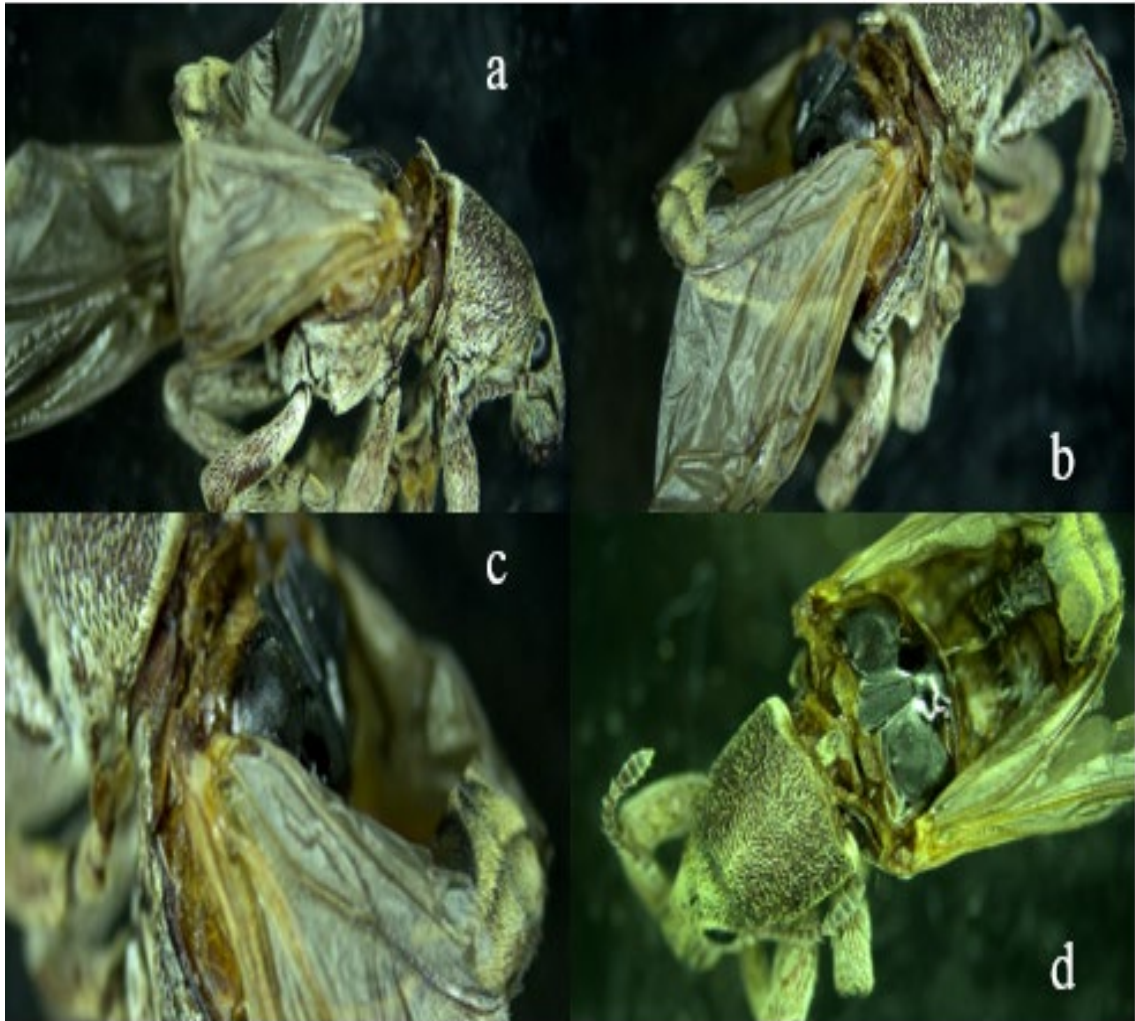


Ilustración 12-4: Adulto de *Gonipterus* sp. descompuesto colectado (Código-M84). a) Vista lateral del lado derecho. b) Vista posterior. c) Vista lateral del abdomen en el lente de 40x. d) Vista frontal.

Realizado por: Romero, 2023.

Tabla 7-4: Descripción de los individuos parasitados de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho.

Realizado por: Romero, 2023.

Nº de rodal	Estadio (adulto/larva)	Código	Descripción de la muestra	Edad de la plantación por rodal	Árboles por hectárea
10	Adulto	M84	Adulto muerto y descompuesto (Ilustración 12-4).	10 – 11 años	49 278 arb/Ha
	Larva	M81	Larva en etapa indefinida momificada.	10 – 11 años	49 278 arb/Ha
8	Adulto	M85	Adulto muerto con presencia de micelio blanco.	10 años	47 749 arb/Ha
	Adulto	M86	2 adultos muertos con presencia de micelio blanco.	10 años	47 749 arb/Ha
	Adulto	M88	Adulto muerto descompuesto.	10 años	47 749 arb/Ha
	Larva	M87	Larva en etapa indefinida momificada con abundante micelio blanco.	10 años	47 749 arb/Ha
	Larva	M89	Larva en etapa inicial con presencia de micelio (Ilustración 10-4).	10 años	47 749 arb/Ha
4	Larva	M68	Larva en etapa indefinida momificada con micelio verde.	10 años	51 715 arb/Ha
	Larva	M72	Larva en etapa indefinida momificada con micelio blanco.	10 años	51 715 arb/Ha
12	Larva	M50	Larva en etapa indefinida momificada.	10 – 11 años	46 370 arb/Ha
	Larva	M54	Larva en etapa indefinida momificada con presencia de micelios (Ilustración 11-4).	10 – 11 años	46 370 arb/Ha

Los individuos de la colecta N°2 en la hacienda Pisangacho presentaron una parasitación a simple vista (**Tabla 7-4**). La parasitación en los diferentes estadios del insecto plaga consistió desde micelio blanco, verde y descomposición en los adultos (**Ilustración 10-4**) (**Ilustración 11-4**) hasta momificación en las larvas (**Ilustración 12-4**).

4.2 Metodología por diluciones seriadas

4.2.1 Morfotipos de solución madre

Tabla 8-4: Promedio de muestras en solución madre.

SOLUCIÓN MADRE			
Muestras	M1	M2	M3
50	15	1	0
54	11	5	0
68	0	0	0
72	10	0	0
84	5	1	0
85	7	3	0
86	2	1	0
87	34	9	0
88	29	6	0
89	6	1	1

Realizado por: Romero, 2023.

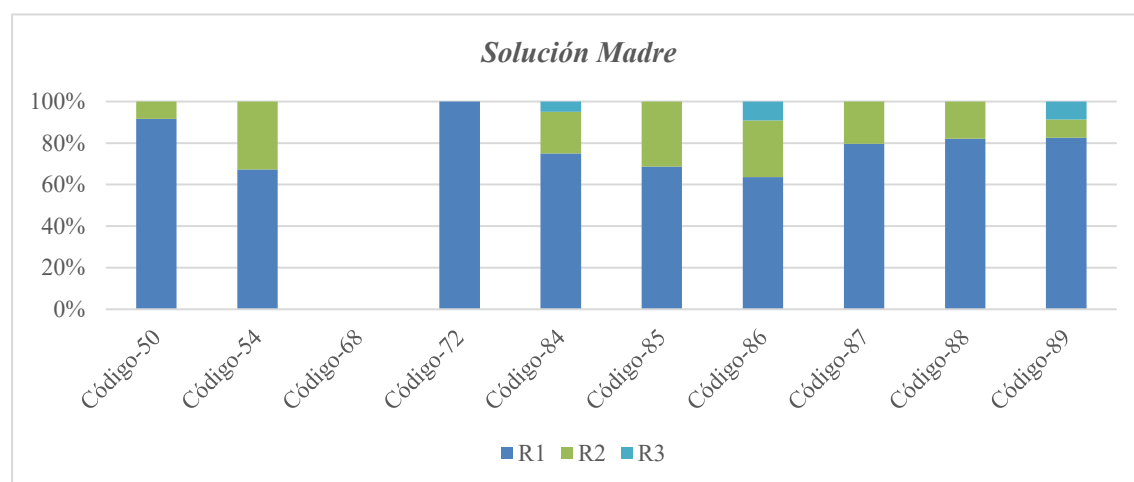


Ilustración 13-4: Abundancia de los morfotipos obtenidos en solución madre en cada una de las muestras.

Realizado por: Romero, 2023.

Para el cálculo de morfotipos en solución madre se estableció un rango de 3 morfotipos: M1 (azul), M2 (verde) y M3 (celeste); y 3 repeticiones: R1, R2 y R3 por cada muestra (**Tabla 8-4**); luego de 96 horas se observó el máximo crecimiento miceliar y se promedió las 3 repeticiones de cada uno de los morfotipos. En la (**Ilustración 13-4**) las barras indican el 100 % del total de cada muestra, las muestras vacías representan que no hubo presencia de colonias fúngicas.

4.2.1.1 Diversidad de colonias fúngicas asociadas a morfotipos de solución madre en relación a cuatro rodales

La diversidad microbiana fúngica asociada a morfotipos de solución madre en cuatro rodales de la hacienda Pisangacho, provincia de Imbabura, cantón San Miguel de Urucuquí; fueron calculadas mediante los Índices de Diversidad (ID). La α -diversidad se calculó por rodales utilizando la riqueza de especies, la diversidad de Shannon y la diversidad de Simpson con base en el número de Hill.

Riqueza de especies:

La riqueza de especies para las colonias fúngicas asociadas a morfotipos de solución madre en cuatro rodales indicó que el rodal 10 (R10) tuvo la mayor diversidad de morfotipos. La riqueza de especies (RS) en el rodal 10 (R10) fue de 3 ± 0 ; los valores de riqueza de especies para los demás rodales fueron: $RS = 2,5 \pm 0,707$ para el rodal 12 (R12); $RS = 1 \pm 0$ para rodal 4 (R4); y $RS = 2,55 \pm 0,79$ para rodal 8 (R8). Por otro lado, el rodal 4 (R4) con $RS = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de riqueza de especies siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 15-4**). El intervalo de confianza señaló esa diferencia en riqueza de especies entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 9-4**).

Tabla 9-4: Intervalo de confianza para la riqueza de especies en solución madre de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R10	3	a
R8	2,55	a
R12	2,5	ab
R4	1	b

Realizado por: Romero, 2023.

Diversidad de Shannon:

La diversidad de Shannon (H') calculada por rodales, señaló que el rodal 10 (R10) tuvo la mayor diversidad (H') de morfotipos por solución madre. El valor de la diversidad (H') para el rodal 10 (R10) fue de $3,06 \pm 0$; los valores de la diversidad de Shannon para los restantes rodales fueron: $H' = 2,54 \pm 0,592$ para el rodal 12 (R12); $H' = 1 \pm 0$ para el rodal 4 (R4); y $H' = 2,47 \pm 1,16$ para

el rodal 8 (R8). El rodal 4 (R4) con $H' = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de la diversidad de Shannon siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 16-4**). El el intervalo de confianza ratificó esa diferencia en el índice de Shannon (H') entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 10-4**).

Tabla 10-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Shannon en solución madre de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R10	3,06	a
R8	2,47	a
R12	2,45	ab
R4	1	b

Realizado por: Romero, 2023.

Diversidad de Simpson:

La diversidad de Simpson (D), que es más sensible a los microbios dominantes o comunes en la comunidad, calculada para cada rodal mostró que el rodal 10 (R10) tuvo la mayor diversidad (D) de morfotipos. El valor de la diversidad de Simpson (D) en el rodal 10 (R10) fue de $3,14 \pm 0$; los valores de la diversidad de Simpson para los demás rodales fueron: $D = 2,42 \pm 0,503$ para el rodal 12 (R12); $D = 1 \pm 0$ para el rodal 4 (R4); y $D = 1,43 \pm 0,857$ para el rodal 8 (R8). El rodal 4 (R4) con $D = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de la diversidad de Simpson siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 17-4**). El el intervalo de confianza ratificó esa diferencia en el índice de Simpson (D) entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 11-4**).

Tabla 11-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Simpson en solución madre de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R10	3,14	a
R12	2,42	ab
R8	1,43	ab
R4	1	b

Realizado por: Romero, 2023.

4.2.2 Morfotipos de dilución 10⁻¹

Tabla 12-4: Pomedio de muestras en dilución 10⁻¹.

DILUCIÓN 10 ⁻¹			
Muestras	M1	M2	M3
50	0	0	0
54	17	17	0
68	0	0	0
72	1	1	0
84	0	0	0
85	6	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	6	4	0
89	0	0	0

Realizado por: Romero, 2023.

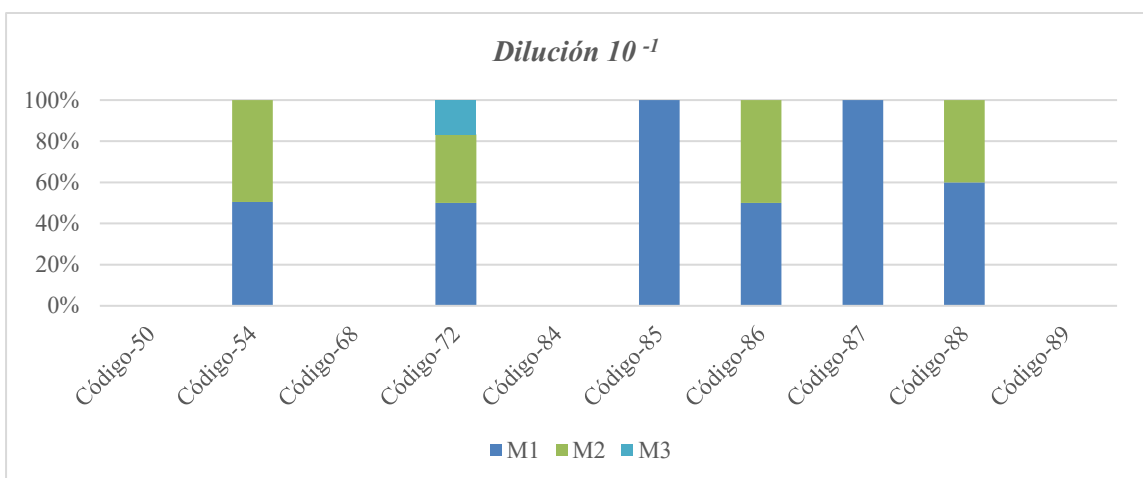


Ilustración 14-4: Abundancia de los morfotipos obtenidos obtenido en dilución 10^{-1} en cada una de las muestras.

Realizado por: Romero, 2023.

Para el cálculo de morfotipos en dilución 10^{-1} se estableció un rango de 3 morfotipos: M1(azul), M2 (verde) y M3 (celeste); y 3 repeticiones: R1, R2 y R3 por cada muestra (**Tabla 12-4**); luego de 96 horas se observó el máximo crecimiento miceliar y se promedió las 3 repeticiones de cada uno de los morfotipos. En la (**Ilustración 14-4**) las barras indican el 100 % del total de cada muestra, las muestras vacías representan que no hubo presencia de colonias fúngicas.

4.2.2.1 *Diversidad de colonias fúngicas asociadas a morfotipos por diluciones seriadas en relación a tres rodales*

La diversidad microbiana fúngica asociada a morfotipos de dilución seriada en tres rodales de la hacienda Pisangacho, provincia de Imbabura, cantón San Miguel de Urcoquí; fueron calculadas mediante los Índices de Diversidad (ID). La α -diversidad se calculó por rodales utilizando la riqueza de especies, la diversidad de Shannon y la diversidad de Simpson con base en el número de Hill.

Riqueza de especies:

La riqueza de especies para las colonias fúngicas asociadas a morfotipos de dilución 10^{-1} en tres rodales indicó que el rodal 8 (R8) tuvo la mayor diversidad de morfotipos. La riqueza de especies (RS) en el rodal 8 (R8) fue de $2,43 \pm 0,864$; los valores de riqueza de especies para los demás rodales fueron: $RS = 1 \pm 0$ para el rodal 4; y $RS = 2 \pm 0$ para el rodal 12 (R12). Por otro lado, el rodal 4 (R4) con $RS = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de riqueza de especies siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 15-4**). El intervalo de confianza señaló esa diferencia en riqueza de especies entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 13-4**).

Tabla 13-4: Intervalo de confianza al 95 % para la riqueza de especies en dilución 10^{-1} de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R8	2,43	a
R12	2	ab

R4	1	b
R10	0	c

Realizado por: Romero, 2023.

Diversidad de Shannon:

La diversidad de Shannon (H') calculada por rodales, señaló que el rodal 8 (R8) tuvo la mayor diversidad (H') de morfotipos por diluciones seriadas. El valor de la diversidad (H') para el rodal 8 (R8) fue de $2,43 \pm 0,864$; los valores de la diversidad de Shannon para los restantes rodales fueron: $H' = 1 \pm 0$ para el rodal 4 (R4); y $H' = 2 \pm 0$ para el rodal 12 (R12). El rodal 4 (R4) con $H' = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de la diversidad de Shannon siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 16-4**). El intervalo de confianza ratificó esa diferencia en el índice de Shannon (H') entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 14-4**).

Tabla 14-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Shannon en dilución 10^{-1} de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R8	2,57	a
R12	2,03	ab
R4	1	b
R10	0	c

Realizado por: Romero, 2023.

Diversidad de Simpson:

La diversidad de Simpson (D), que es más sensible a los microbios dominantes o comunes en la comunidad, calculada para cada rodal mostró que el rodal 12 (R12) tuvo la mayor diversidad (D) de morfotipos. El valor de la diversidad de Simpson (D) en el rodal 12 (R12) fue de $2,06 \pm 0$; los valores de la diversidad de Simpson para los demás rodales fueron: $D = 1 \pm 0$ para el rodal 4 (R4); y $D = 1,41 \pm 0,988$ para el rodal 8 (R8). El rodal 4 (R4) con $D = 1 \pm 0$, tuvo los niveles más bajos de la diversidad de Simpson siendo la menos diversa entre los rodales (**Ilustración 17-4**). El intervalo de confianza ratificó esa diferencia en el índice de Simpson (D) entre rodales de la hacienda Pisangacho (**Tabla 15-4**).

Tabla 15-4: Intervalo de confianza para la diversidad de Simpson en dilución 10^{-1} de morfotipos en diferentes rodales. Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el intervalo de confianza al 95 %.

Intervalo de confianza		
Rodal	Índice	Rango
R12	2,06	a
R8	1,41	ab
R4	1	b
R10	0	c

Realizado por: Romero, 2023.

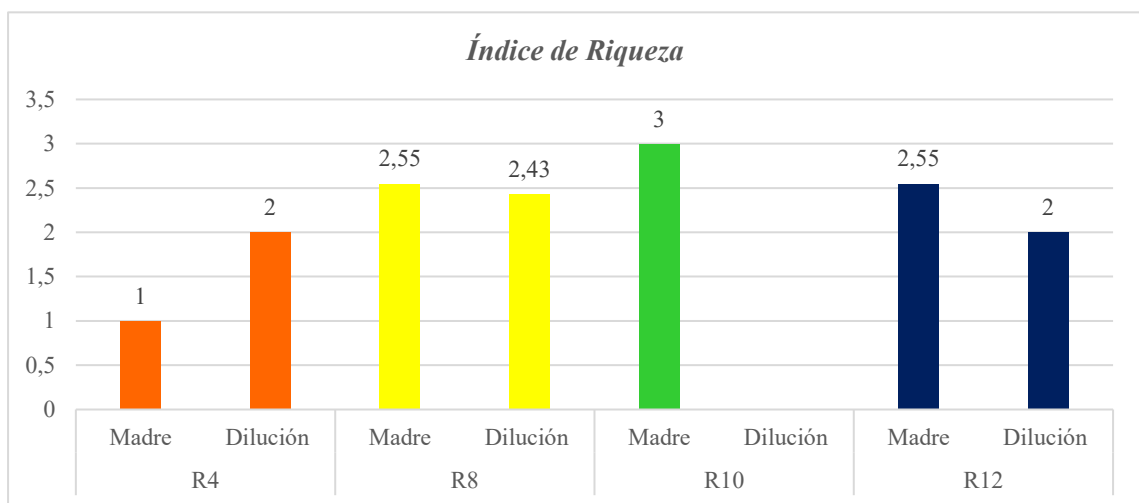


Ilustración 15-4: Índice de riqueza de especies entre solución madre y dilución 10^{-1} .

Realizado por: Romero, 2023.

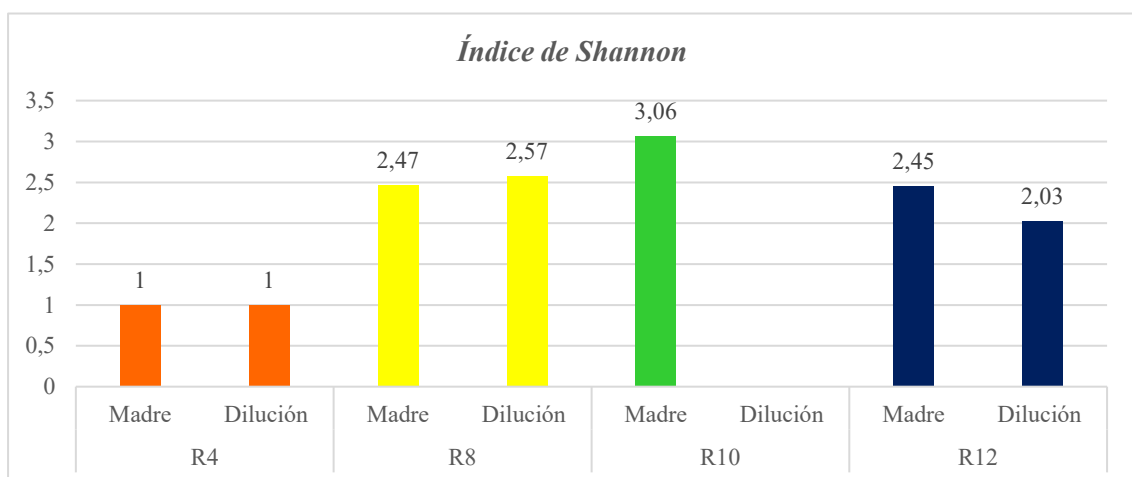


Ilustración 16-4: Índice de Shannon entre solución madre y dilución 10^{-1} .

Realizado por: Romero, 2023.

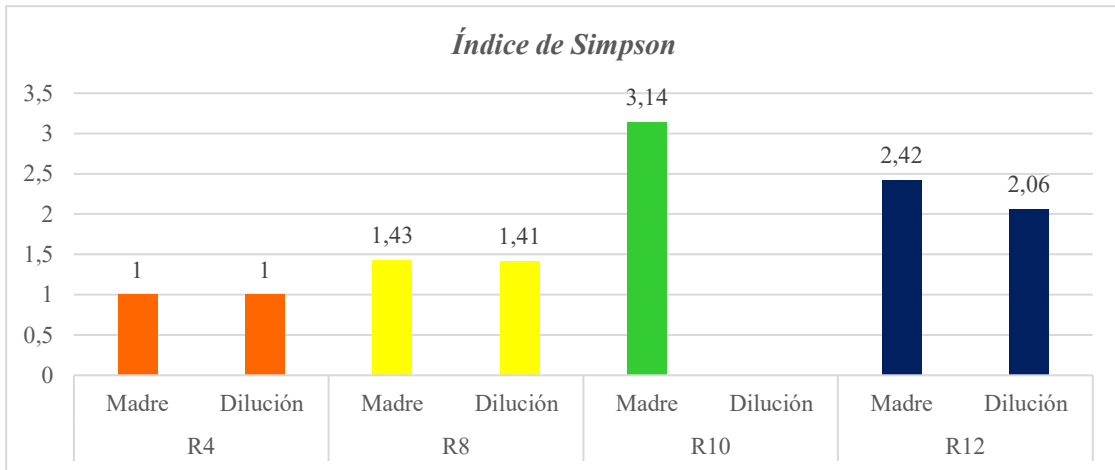


Ilustración 17-4: Índice de Simpson entre solución madre y dilución 10^{-1} .

Realizado por: Romero, 2023.

4.3 Metodología de aislamiento directo

Tabla 16-4: Resultados por siembra directa.

Muestra	Resultado
33	<i>Fusarium sp.</i>
	<i>Beauveria bassiana</i>
	<i>Beauveria bassiana</i>
85	<i>Alternaria arborescens</i>
86	<i>Epicoccum nigrum</i>
	<i>Fusarium sp.</i>

Realizado por: Romero, 2023.

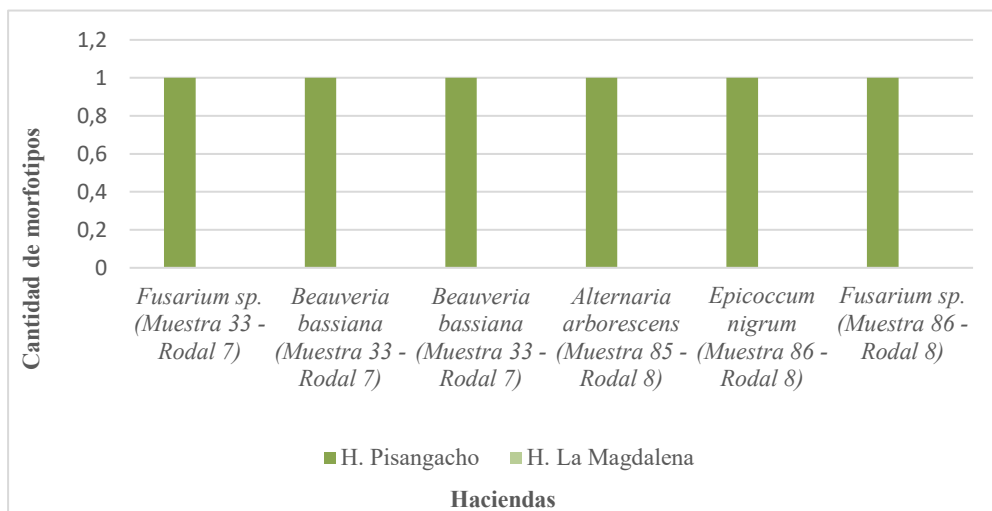


Ilustración 18-4: Interpretación de los morfotipos obtenidos en aislamiento directo.

Realizado por: Romero, 2023.

4.4 Comparación de aislamientos para hongos entomopatógenos en *Gonipterus* sp.

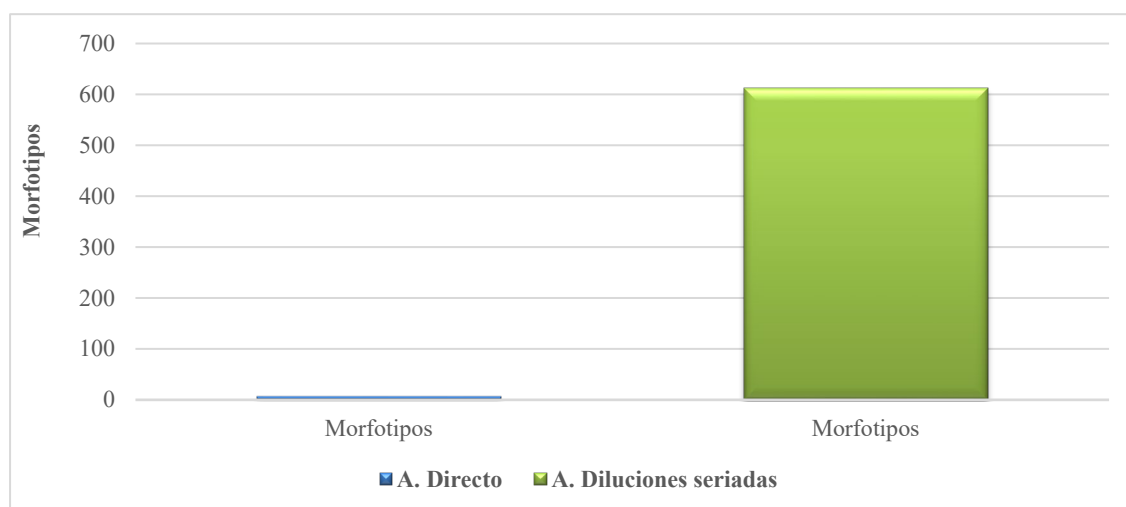


Ilustración 19-4: Representación de morfotipos en 2 diferentes aislamientos.

Realizado por: Romero, 2023.

En el aislamiento directo se presentaron 6 morfotipos y en el aislamiento por diluciones seriadas se obtuvo un total del 611 aislados (**Ilustración 19-4**). A pesar de tener mayor diversidad de morfotipos en la metodología de aislamiento por diluciones seriadas, para la caracterización cultural, morfológica y molecular se tomó en cuenta únicamente a los morfotipos de la metodología por aislamiento directo, ya que sus características indicaron un alto potencial de posibles hongos entomopatógenos (**Tabla 16-4**) (**Ilustración 18-4**).

4.5 Caracterización de entomopatógenos

Para cumplir con la caracterización cultural, morfológica y molecular se eligió a los 6 morfotipos del aislamiento por método directo, ya que a pesar de tener una menor diversidad en morfotipos, sus resultados están más asociados a posibles hongos entomopatógenos que actúan a manera de controlador biológico en plagas.

4.5.1 Morfotipos por diluciones seriadas

Morfotipo 89-R2: Solución madre

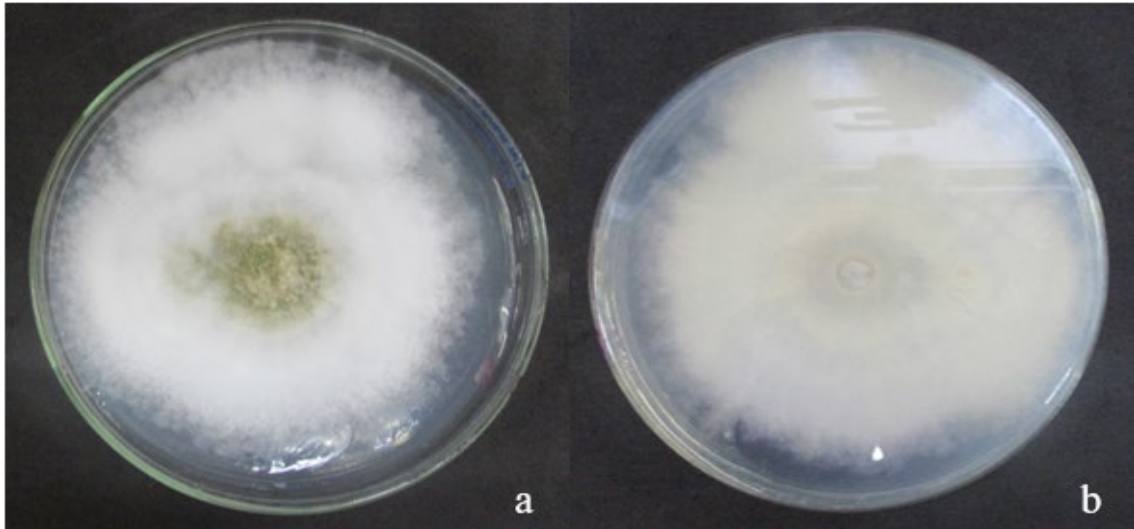


Ilustración 20-4: Características culturales del morfotipo 89-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Morfotipo 87-R2: Solución madre

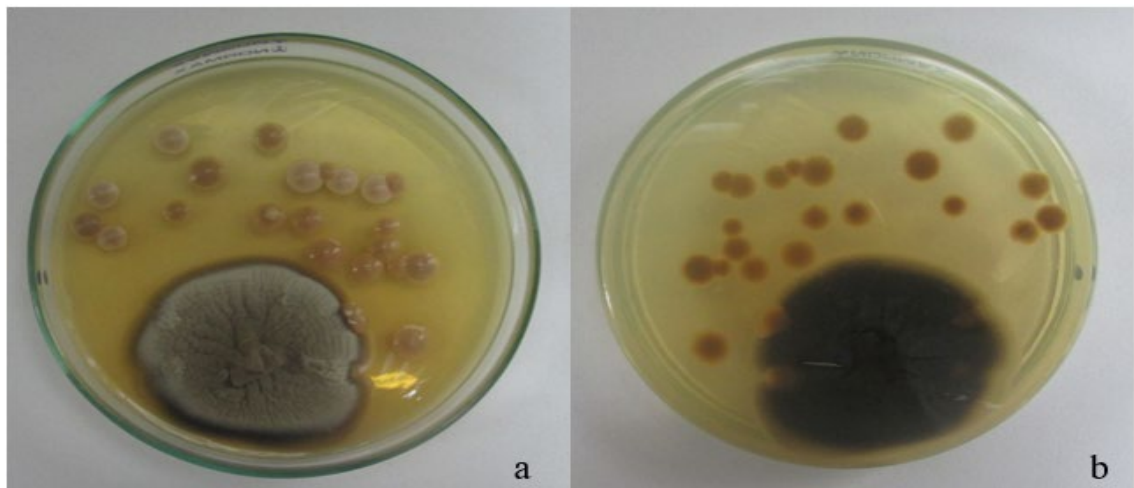


Ilustración 21-4: Características culturales de del morfotipo 87-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Morfotipo 88-R2: Solución madre

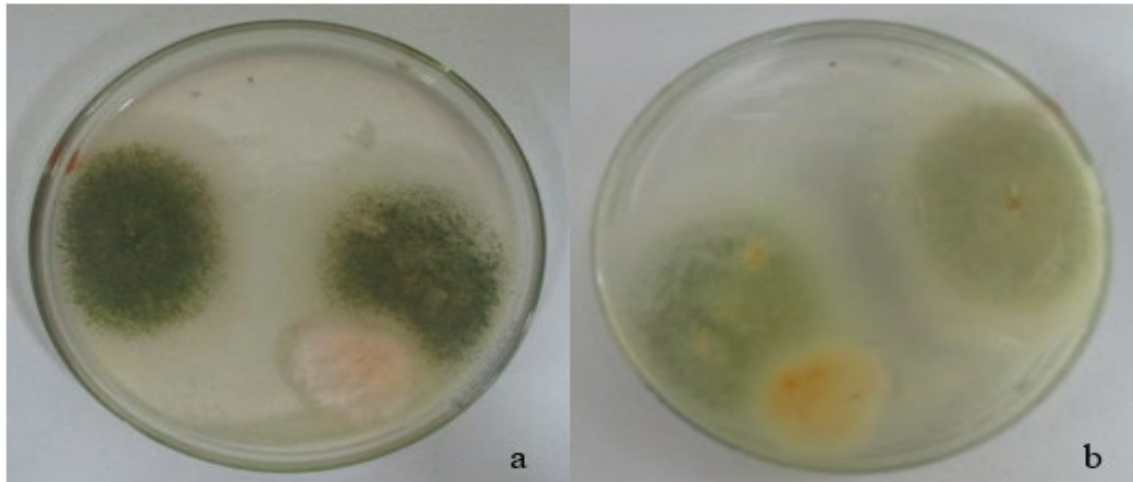


Ilustración 22-4: Características culturales del morfotipo 88-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Morfotipo 86-R3: Dilución seriada

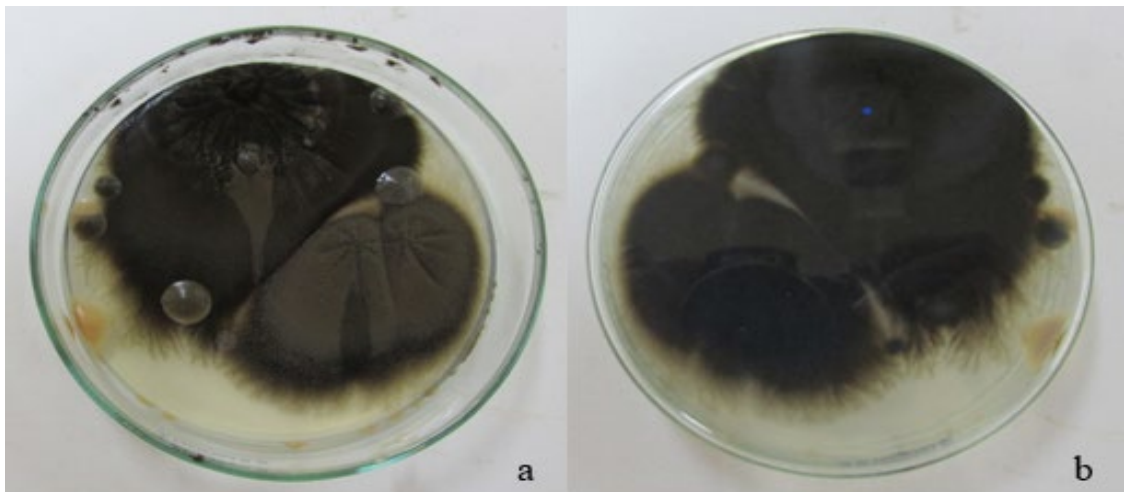


Ilustración 23-4: Características culturales del morfotipo 86-R3: Dilución seriada. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Morfotipo 87-R2: Solución madre

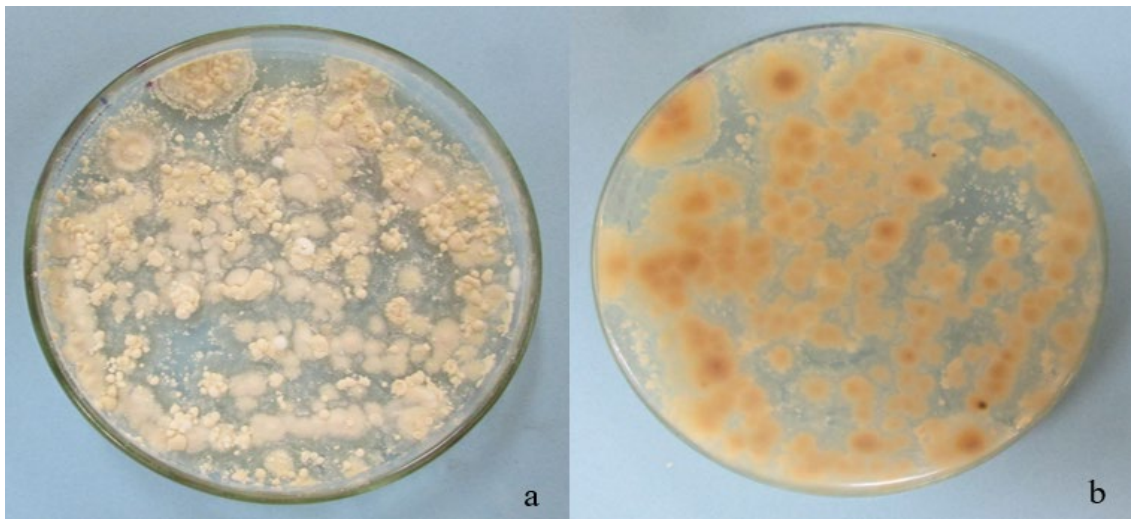


Ilustración 24-4: Características culturales del morfotipo 87-R2: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Morfotipo 85-R1: Solución madre

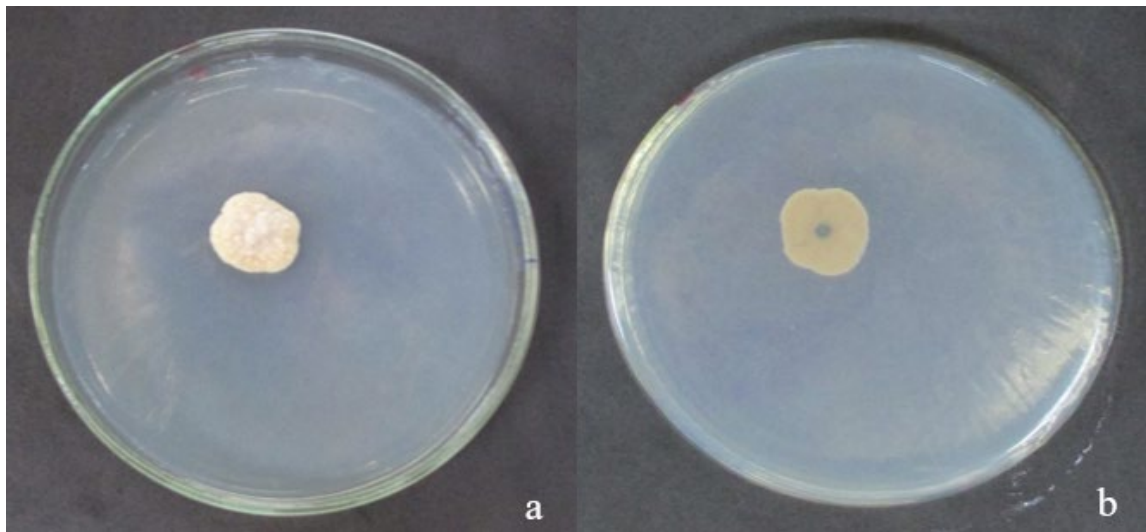


Ilustración 25-4: Características culturales del morfotipo 85-R1: Solución madre. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

4.5.2 Morfotipos por aislamiento directo

Morfotipo 33-R2(2): *Fusarium* sp.

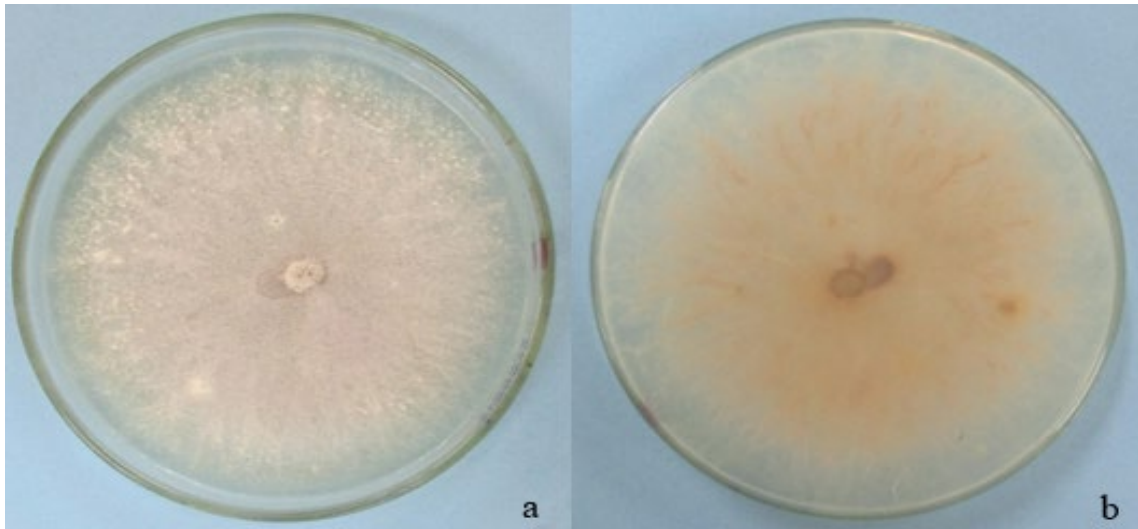


Ilustración 26-4: Características culturales de *Fusarium* sp. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 33-R2(2) fueron obtenidos de la muestra 33 y señalaron características similares al género *Fusarium* sp. Las cepas presentaron un crecimiento con forma circular, con elevación umbonada, con bordes crenada y con superficies enteras. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración agua de rosas (11-1408 TCX) en el lado anverso; mientras que, en el lado reverso poseen una coloración totalmente luz solar (13-0822 TCX) (Tabla 17-4) (Ilustración 26-4).

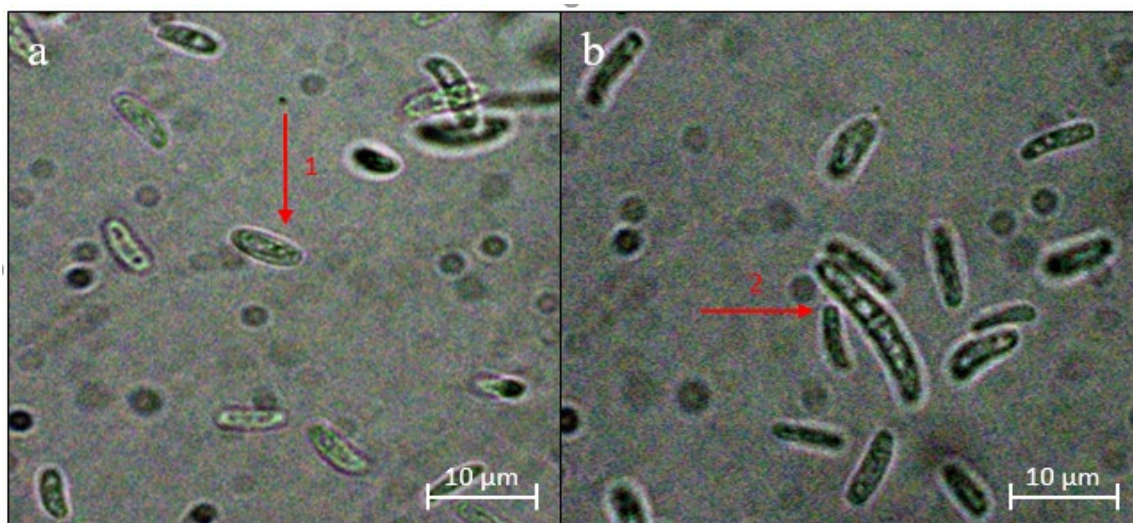


Ilustración 27-4: Características morfológicas de *Fusarium* sp. a) El 1 indica una microconidias.
b) El 2 señala una macroconidias.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 33-R2(2), presentó una alta esporulación de microconidias y macroconidias. Las microconidias presentaron 7 µm de largo x 2 µm de ancho. Mientras que las macroconidias presentaron una forma semicurva con más de 6 septos de 3 µm, estas características coinciden con el género *Fusarium* sp. (**Ilustración 27-4**).

Tabla 17-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Fusarium* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
33-R2(2)	Circular	Umbonada	Crenada	Entera	Agua de rosas	Luz solar	7	2

Realizado por: Romero, 2023.

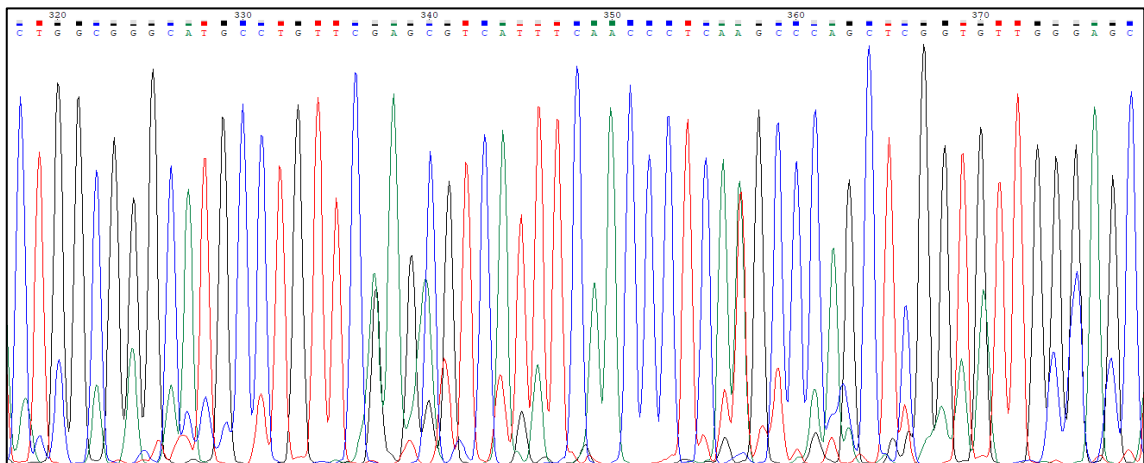


Ilustración 28-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R2(2): 455, en el programa Chromas 2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Fusarium graminearum isolate CMM121-45 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...	Fusarium grami...	819	819	100%	0.0	99.12%	517	OQ271379.1
Fusarium asiaticum isolate HL15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed...	Fusarium asiatic...	819	819	100%	0.0	99.12%	532	OQ061466.1
Fusarium graminearum isolate SICAUCC-22-136 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: inte...	Fusarium grami...	819	819	100%	0.0	99.12%	543	OP963836.1
Fusarium asiaticum isolate fazm2022 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri...	Fusarium asiatic...	819	819	100%	0.0	99.12%	545	OP757660.1
Fusarium graminearum strain 57H small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe...	Fusarium grami...	819	819	100%	0.0	99.12%	583	OP699805.1
Fusarium asiaticum isolate MHT5-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Fusarium asiatic...	819	819	100%	0.0	99.12%	506	OP687925.1
Fusarium asiaticum isolate MHT5-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Fusarium asiatic...	819	819	100%	0.0	99.12%	506	OP687924.1
Fusarium asiaticum isolate MHT5-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Fusarium asiatic...	819	819	100%	0.0	99.12%	506	OP687923.1
Fusarium graminearum isolate SWFU.000118 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosom...	Fusarium grami...	819	819	100%	0.0	99.12%	535	OP617345.1
Fusarium graminearum isolate SWFU.000117 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosom...	Fusarium grami...	819	819	100%	0.0	99.12%	554	OP617344.1

Ilustración 29-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 517.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular demostró los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 33-R2(2), indicó en su cromatograma un tamaño de 455 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 99,12 %, con la accesión OQ271379,1 que corresponde a el género *Fusarium* sp. **(Ilustración 28-4) (Ilustración 29-4).**

Morfotipo 33-R3(2): *Beauveria bassiana*

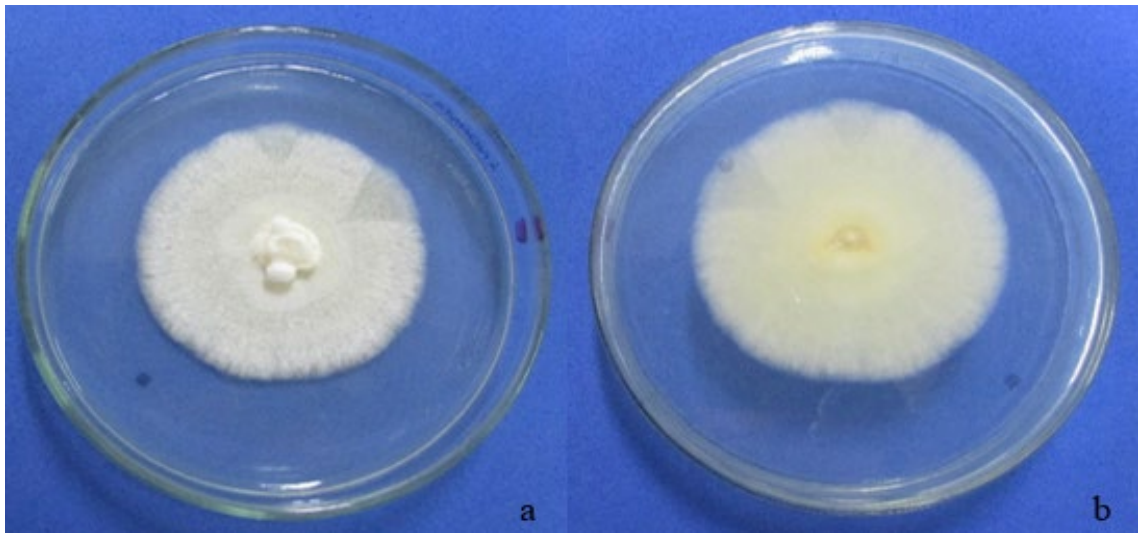


Ilustración 30-4: Características culturales de *Beauveria bassiana*. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 33-R3(2), fueron obtenidos de la muestra 33 y señalaron características similares a la especie *Beauveria bassiana*. Las cepas indicaron una forma irregular, una elevación efusa y rizada, un borde rizada, y una superficie rugosa y concéntrica. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración blanc de blanc (11-4800 TCX) en el lado anverso; mientras que, en el lado reverso poseen una coloración totalmente blanco nieve (11-0602 TCX) **(Tabla 18-4) (Ilustración 30-4).**

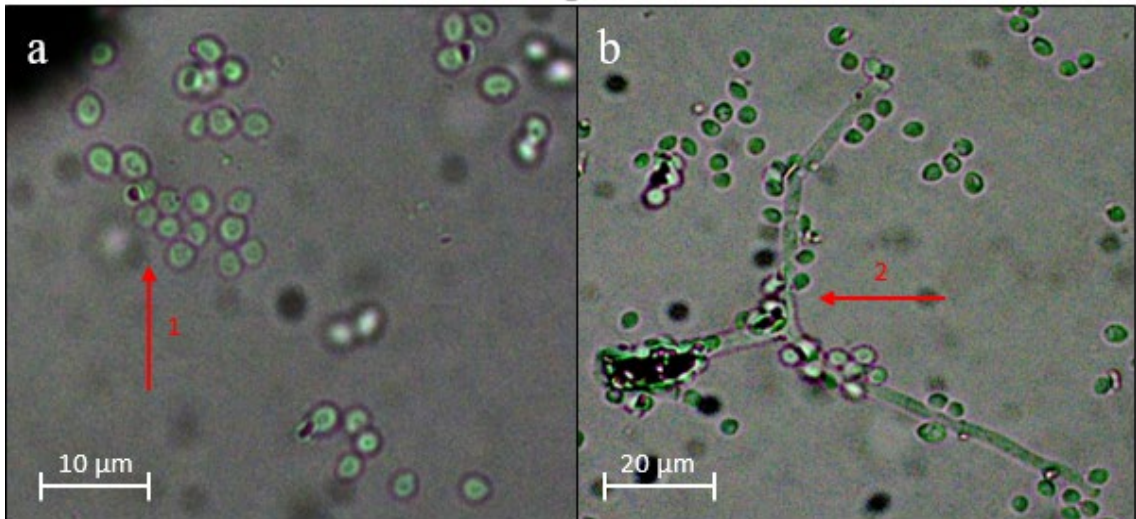


Ilustración 31-4: Características morfológicas de *Beauveria bassiana*. a) El 1 señala esporas esféricas levemente ovadas. b) El 2 indica la proliferación simpodial del conidióforo.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 33-R3(2), presentó una elevada esporulación de esporas esféricas levemente ovadas de 2 µm de largo x 2 µm de ancho. Una proliferación simpodial del conidióforo, estas características coinciden con la especie *Beauveria bassiana* (**Ilustración 31-4**).

Tabla 18-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Beauveria bassiana*

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
33-R3(2)	Irregular	Rizada	Rizada	Concéntrica	Blanc de blanc	Blanco nieve	2	2

Realizado por: Romero, 2023.

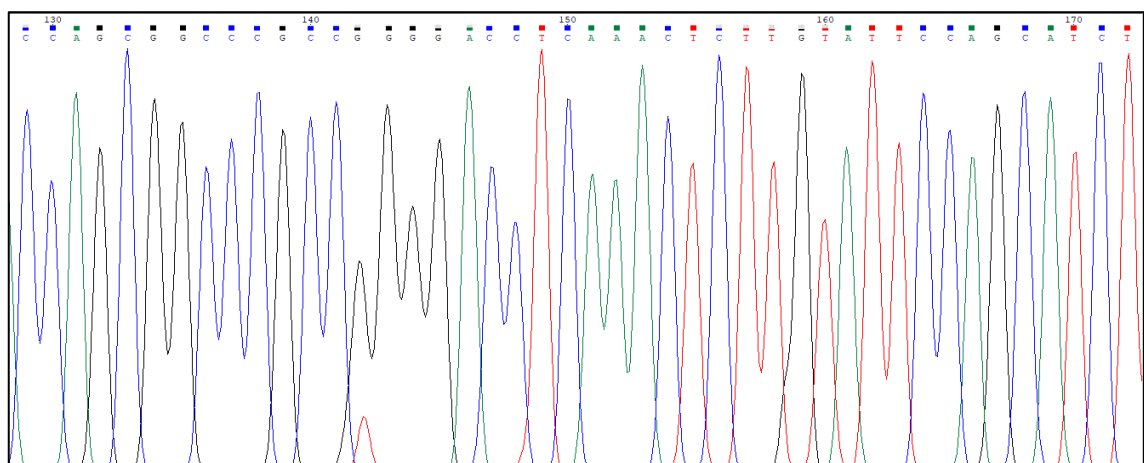


Ilustración 32-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R3(2): 491, en el programa Chromas 2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
Beauveria sp. cepa 149 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de ARN ribosomal 5.8S...	Beauveria sp.	907	907	100%	0.0	100,00%	528	MN871700.1
aislado de Beauveria bassiana ERL923 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de ARN...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	543	MN122413.1
Beauveria sp. cepa 149 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de ARN ribosomal 5.8S...	Beauveria sp.	907	907	100%	0.0	100,00%	517	MN883874.1
Vale de Beauveria bassiana AUMC3873 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parc...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	571	MN710408.1
Beauveria bassiana cepa B-Bug gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia parcial. esp...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	638	MK862359.1
aislado de Beauveria bassiana ICAR-CTCRI1 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuen...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	605	MN647585.1
Beauveria bassiana cepa HBM10 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de ARN riboso...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	561	MN427871.1
Beauveria bassiana cepa LPSc1363 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia parcial...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	576	MK100320.1
Beauveria bassiana aislado gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña A3. secuencia parcial. espa...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	570	MN428795.1
Beauveria bassiana aislado A2 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia parcial. espa...	Beauveria bassi...	907	907	100%	0.0	100,00%	571	MN428792.1

Ilustración 33-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 528.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular demostró los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 33-R3(2), indicó en su cromatograma un tamaño de 491 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MN871700,1 que corresponde a la especie *Beauveria bassiana* (**Ilustración 32-4**) (**Ilustración 33-4**).

Morfotipo 33-R4: *Beauveria bassiana*

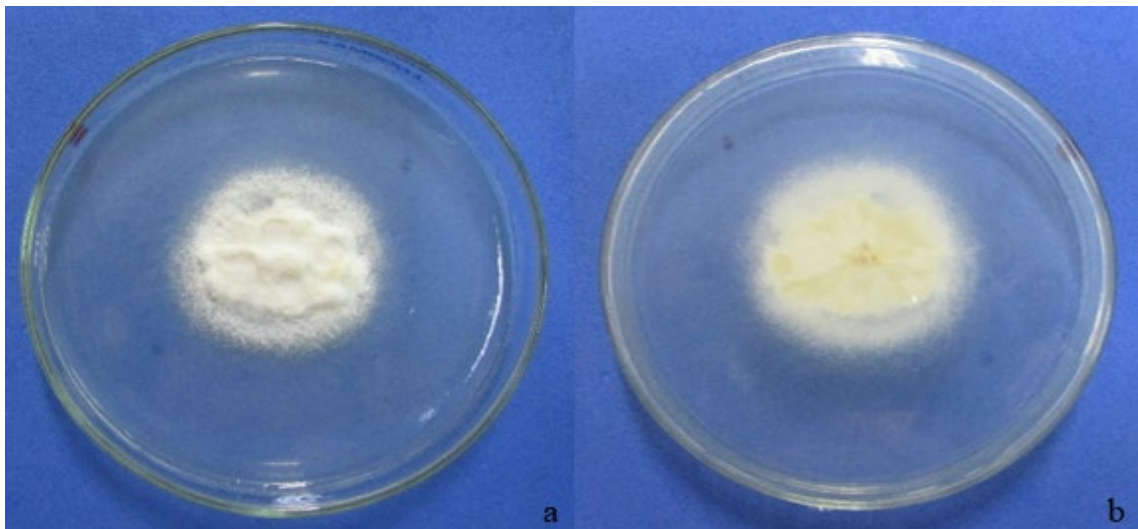


Ilustración 34-4: Características culturales de *Beauveria bassiana*. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 33-R4, fueron obtenidos de la muestra 33 y señalaron características similares a la especie *Beauveria bassiana*. Las cepas indicaron una forma irregular, una elevación efusa y algo rizada, un borde rizada y una superficie rugosa. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración blanc de blanc (11-4800 TCX) en el lado anverso; mientras que, en el lado reverso poseen una coloración totalmente doble crema (12-0715 TCX) (Tabla 19-4) (Ilustración 34-4).

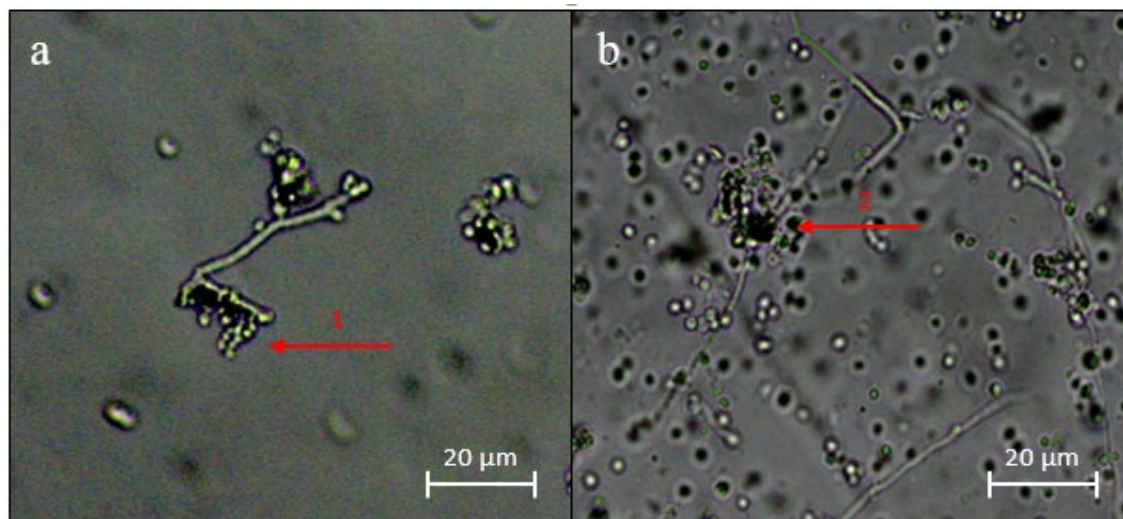


Ilustración 35-4: Características morfológicas de *Beauveria bassiana*. a) El 1 indica conidióforos con esporas en cadena. b) El 2 señala la maduración de un conidióforo.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 33-R4, presentó la formación de un conidióforo completo a partir de un conidio, con un tamaño de 1,1 µm de largo x 1,7 µm de ancho; acompañada de hifas segmentadas, estas características coinciden con la especie *Beauveria bassiana* (Ilustración 35-4).

Tabla 19-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Beauveria bassiana*.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
33-R4	Irregular	Efusa	Rizada	Rugosa	Blanc de blanc	Doble crema	1,1	1,7

Realizado por: Romero, 2023.

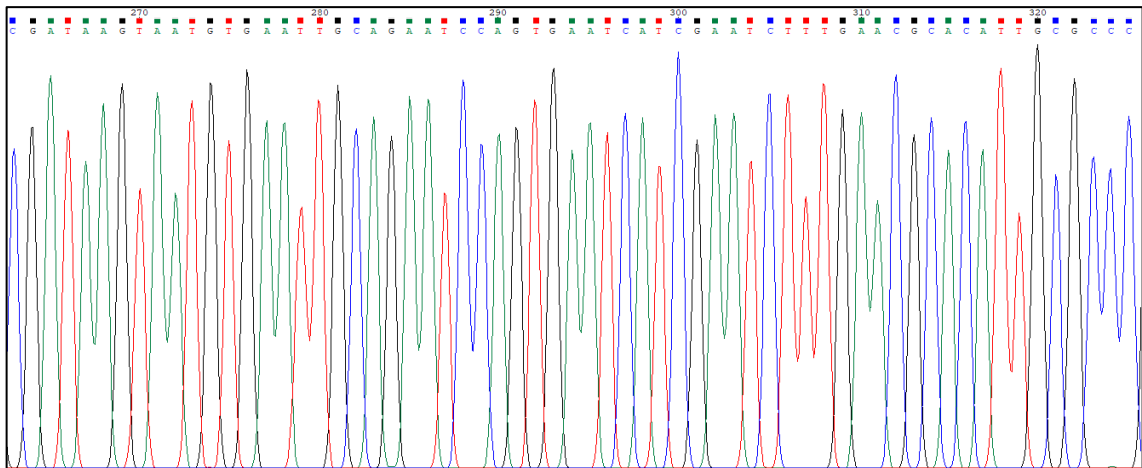


Ilustración 36-4: Cromatograma secuencial de la muestra 33-R4: 495, en el programa Chromas

2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Beauveria sp. strain 149 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr...	Beauveria sp.	915	915	100%	0.0	100.00%	528	MN871700.1
Beauveria sp. strain 149 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr...	Beauveria sp.	915	915	100%	0.0	100.00%	517	MN883874.1
Beauveria bassiana voucher AUMC3873 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	571	MN710408.1
Beauveria bassiana strain B-Bug small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	638	MK862359.1
Beauveria bassiana strain HBM10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	561	MN427871.1
Beauveria bassiana strain LPSc1363 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	576	MK100320.1
Beauveria bassiana isolate A3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	570	MN428795.1
Beauveria bassiana isolate A2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	571	MN428792.1
Beauveria bassiana strain HZBB160701 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	2287	MH521027.1
Beauveria bassiana isolate BR internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and inte...	Beauveria bassia...	915	915	100%	0.0	100.00%	543	MK918495.1

Ilustración 37-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 528.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular indicó los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 33-R4, probó en su cromatograma un tamaño de 495 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MN871700,1 que corresponde a la especie *Beauveria bassiana* (Ilustración 36-4) (Ilustración 37-4).

Morfotipo 85-R(1): *Alternaria arborescens*

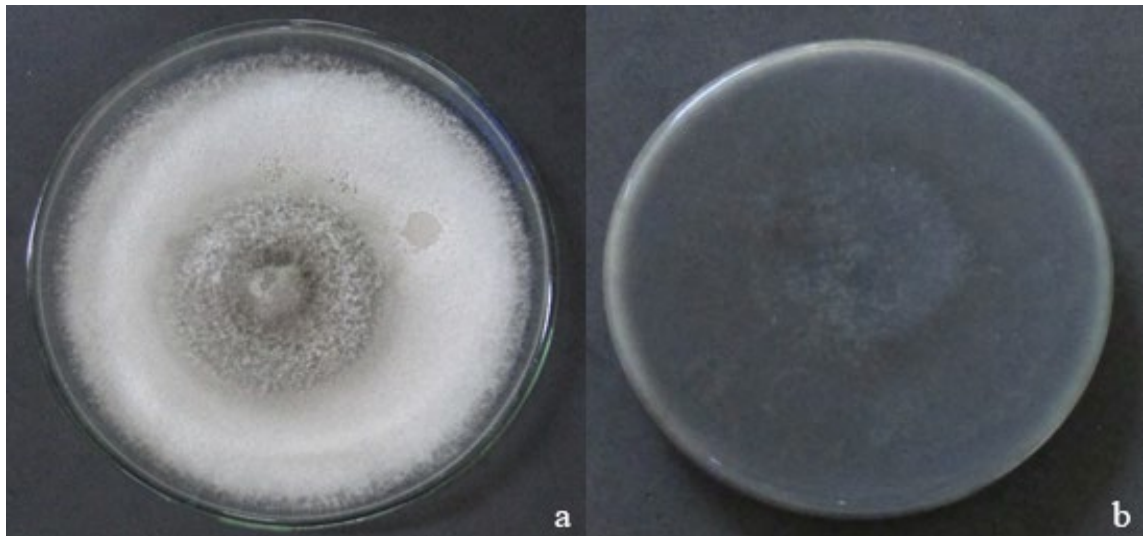


Ilustración 38-4: Características culturales de *Alternaria arborescens*. a) Lado anverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 85-R(1), fueron obtenidos de la muestra 85 y señalaron características similares a la especie *Alternaria arborescens*. Las cepas indicaron una forma irregular, una elevación rizada, un borde rizado, y una superficie concéntrica. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración arena blanca (13-0002 TCX) en el lado anverso; mientras que, en el lado reverso poseen una coloración totalmente negro azabache (19-0303 TCX) (**Tabla 20-4**) (**Ilustración 38-4**).

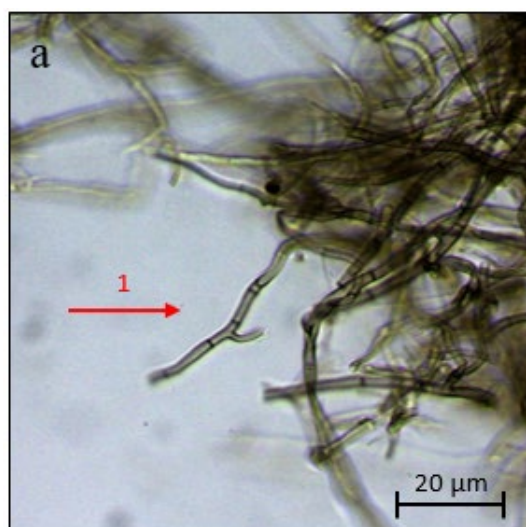


Ilustración 39-4: Características morfológicas de *Alternaria arborescens*. a) El 1 indica un conidióforo a partir de micelio.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 85-R(1), presentó la formación de un conidióforo a partir de micelio, con un tamaño de 10 µm de largo x 4 µm de ancho; estas características coinciden con la especie *Alternaria arborescens* (Ilustración 39-4).

Tabla 20-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Alternaria arborescens*.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
85-R(1)	Irregular	Rizada	Rizada	Concéntrica	Arena blanca	Negro azabache	10	4

Realizado por: Romero, 2023.

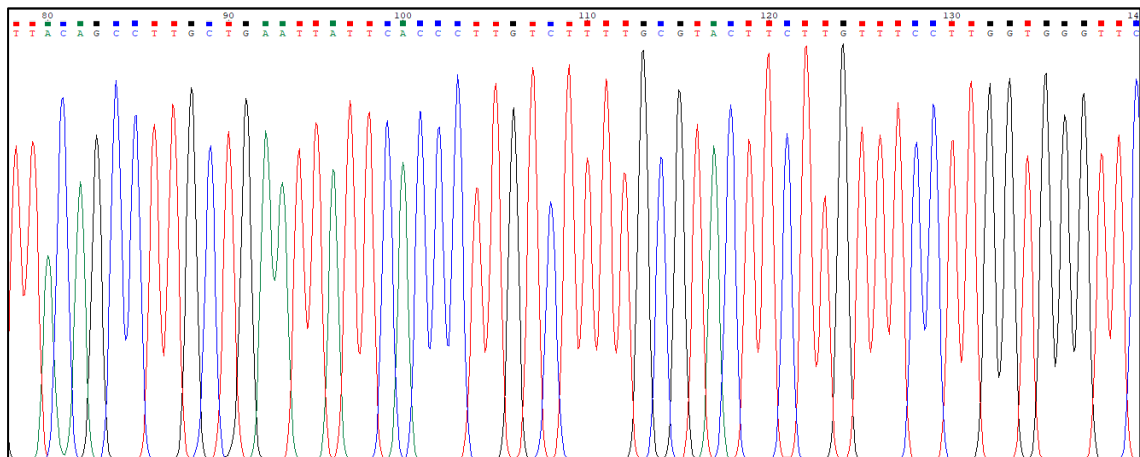


Ilustración 40-4: Cromatograma secuencial de la muestra 85-R(1): 517, en el programa Cromas

2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
Alternaria arborescens aislado R3 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria arbor...	955	955	100%	0.0	100.00%	570	MT420628.1
Alternaria sp. aislar el gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña R15 .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	570	MT420614.1
Alternaria sp. vale HQU PS27 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	572	MK640592.1
Alternaria sp. vale HQU PS25 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	575	MK640590.1
Alternaria sp. vale HQU PS11 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	575	MK640576.1
Alternaria sp. vale HQU PS06 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	571	MK640573.1
Alternaria sp. vale HQU PS01 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	572	MK640569.1
Alternaria sp. vale HQU PR04 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial. gen de A...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	571	MK640558.1
Alternaria sp. aislar Melodinus suaveolens espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribosom...	Alternaria sp.	955	955	100%	0.0	100.00%	552	MT089927.1
Alternaria alternata cepa NF22 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribosom...	Alternaria altern...	955	955	100%	0.0	100.00%	561	MT077170.1

Ilustración 41-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 570.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular enseñó los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 85-R(1), comprobó en su cromatograma un tamaño de 517 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MT420628,1 que corresponde a la especie *Alternaria arborescens* (Ilustración 40-4) (Ilustración 41-4).

Morfotipo 86-R1(2): *Epicoccum nigrum*

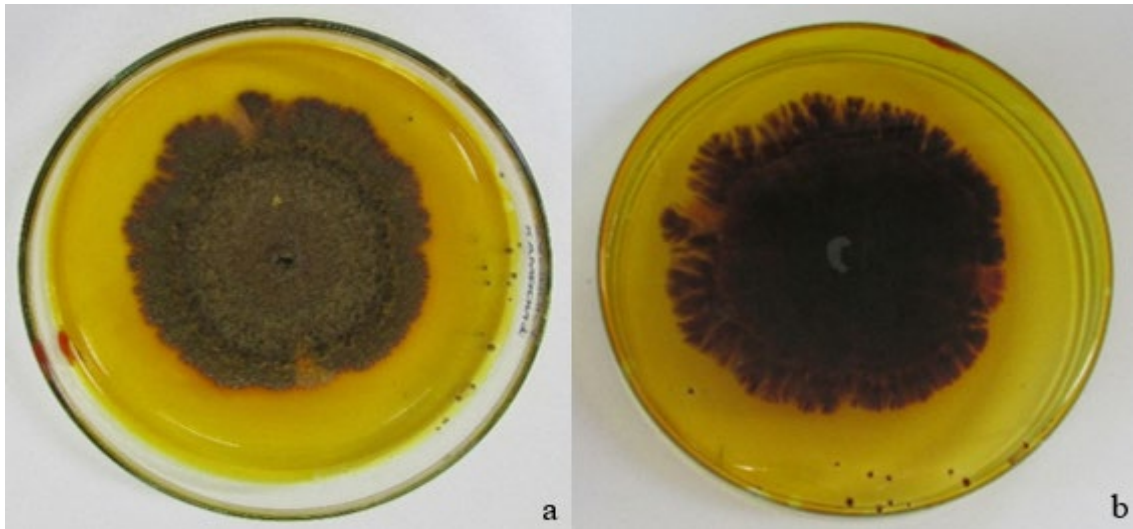


Ilustración 42-4: Características culturales de *Epicoccum nigrum*. a) Lado adverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 86-R1(2), fueron obtenidos de la muestra 86 y señalaron características similares a la especie *Epicoccum nigrus*. Las cepas indicaron una forma irregular y filamentosa, una elevación efusa y rizada, un borde rizada y filamentosa, y una superficie rugosa y concéntrica. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración en el lado anverso bracken (19-1015 TCX) con filos iluminación (13-0647 TCX); mientras que, en el lado reverso poseen una coloración marrón oscuro monótono (#4A412A) con filos iluminación (13-0647 TCX); (Tabla 21-4) (Ilustración 42-4).

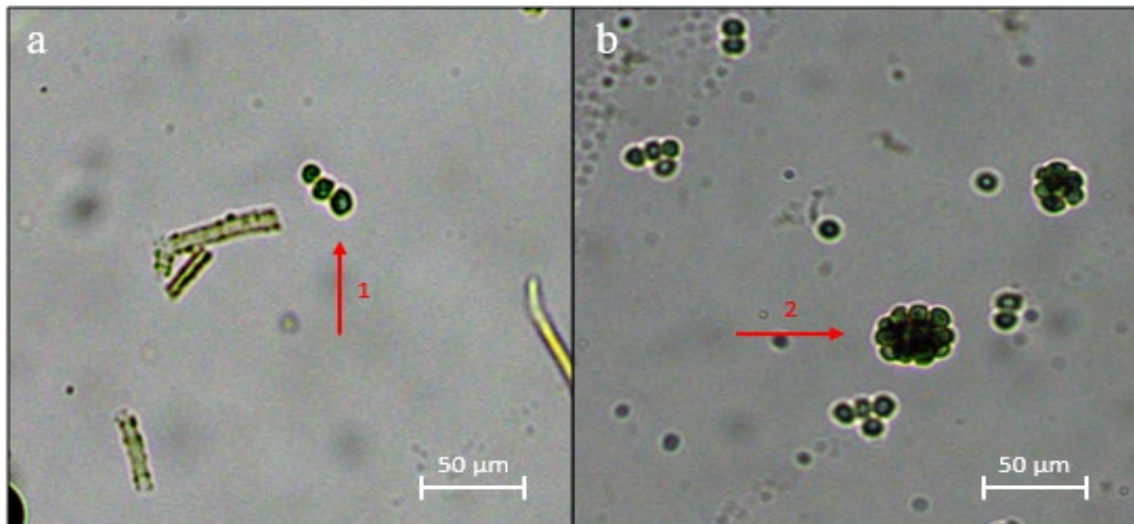


Ilustración 43-4: Características morfológicas de *Epicoccum nigrum*. a) El 1 indica blastoconidios verrugosos y esféricos. b) El 2 señala conidios sin presencia de esporangios.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 86-R1(2), presentó blastoconidios con un tamaño de 9 µm de largo x 8,5 µm de ancho con formas rugosas y esféricas; estas características coinciden con la especie *Epicoccum nigrum* (**Ilustración 43-4**).

Tabla 21-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Epicoccum nigrum*.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de espora (µm)	
							L	A
86-R1(2)	Irregular y filamentosa	Efusa y rizada	Rizada y filamentosa	Rugosa y concéntrica	Bracken e iluminador	Marrón oscuro monótono	9	8,5

Realizado por: Romero, 2023.

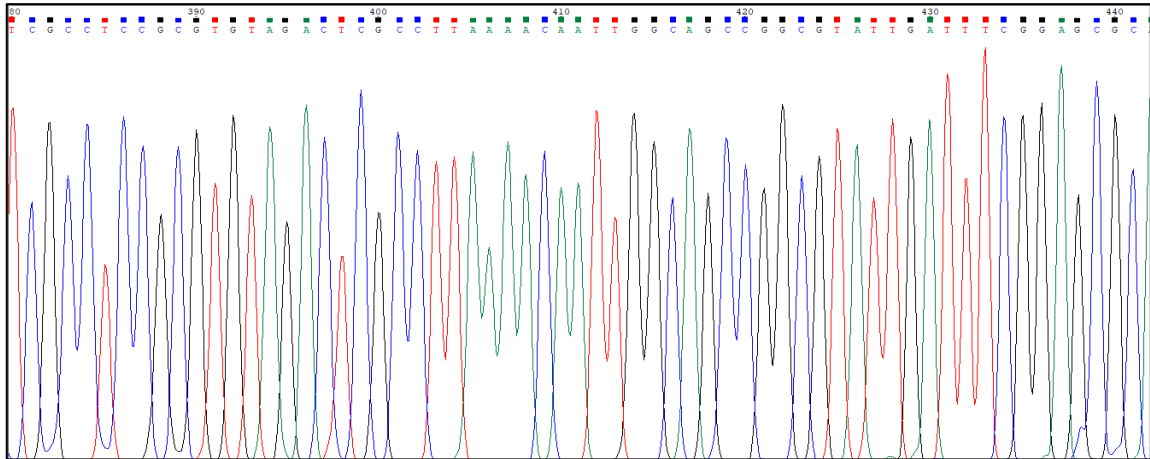


Ilustración 44-4: Cromatograma secuencial de la muestra 86-R1(2): 442, en el programa Chromas 2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
Cultivo de <i>Epicoccum nigrum</i> MUT<ITA>:6268 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen d...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	516	MN947593.1
Hongos sp. Genes E35 para ITS1_5.8S rRNA ITS2 .secuencia parcial y completa	hongos sp.	817	817	100%	0.0	100.00%	556	LC425682.1
Epicoccum nigrum aislado RM118 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña .secuencia parcial. e...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	562	MG602540.1
Epicoccum sp. cepa UASWS1647 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña .secuencia parcial. es...	Epicoccum sp.	817	817	100%	0.0	100.00%	544	MG719628.1
Epicoccum nigrum cepa AO-F-MEA-16 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN r...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	484	MH101377.1
Epicoccum nigrum aislado ECU48 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribos...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	514	MF435096.1
Epicoccum nigrum aislado JPS13 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribos...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	475	KT184743.1
Epicoccum sp. NsE+22 espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribosomal 5.8S ...	Epicoccum sp....	817	1062	100%	0.0	100.00%	871	KR780620.1
aislado de Epicoccum nigrum PAV-M 1.043 gen de ARN ribosomal 18S .secuencia parcial. espaciador i...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	542	KF993407.1
Epicoccum nigrum cepa EF70c espaciador interno transcrito 1 .secuencia parcial. gen de ARN ribosom...	Epicoccum nigrum	817	817	100%	0.0	100.00%	531	KT355005.1

Ilustración 45-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 516.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular indicó los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 86-R1(2), probó en su cromatograma un tamaño de 442 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MN947593,1 que corresponde a la especie *Epicoccum nigrum* (Ilustración 44-4) (Ilustración 45-4).

Morfotipo 86-R3(1): *Fusarium* sp.

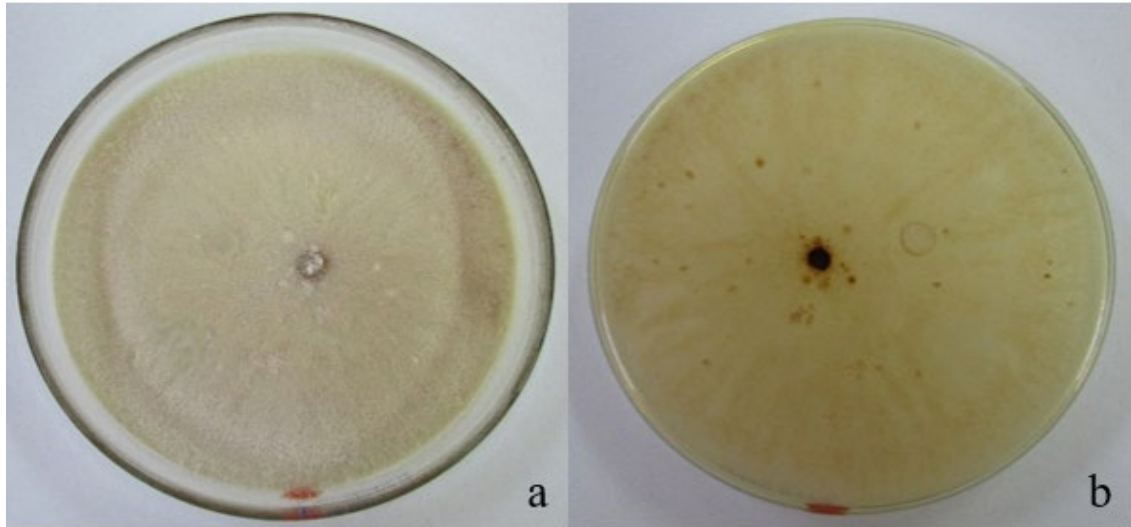


Ilustración 46-4: Características culturales de *Fusarium* sp. a) Lado adverso. b) Lado reverso.

Realizado por: Romero, 2023.

Los aislados del morfotipo 86-R3(1), fueron obtenidos de la muestra 86 y señalaron características similares a la especie *Fusarium* sp. Presentaron un crecimiento con forma circular y filamentosa, con elevación efusa, con bordes filamentosa, y con superficie radial. Según la paleta de Pantone, poseen una coloración crema (#FFFC5D) en el lado anverso; mientras que, en el lado reverso poseen una coloración amarilla transparente (11-0617 TPX) (Tabla 22-4) (Ilustración 46-4).

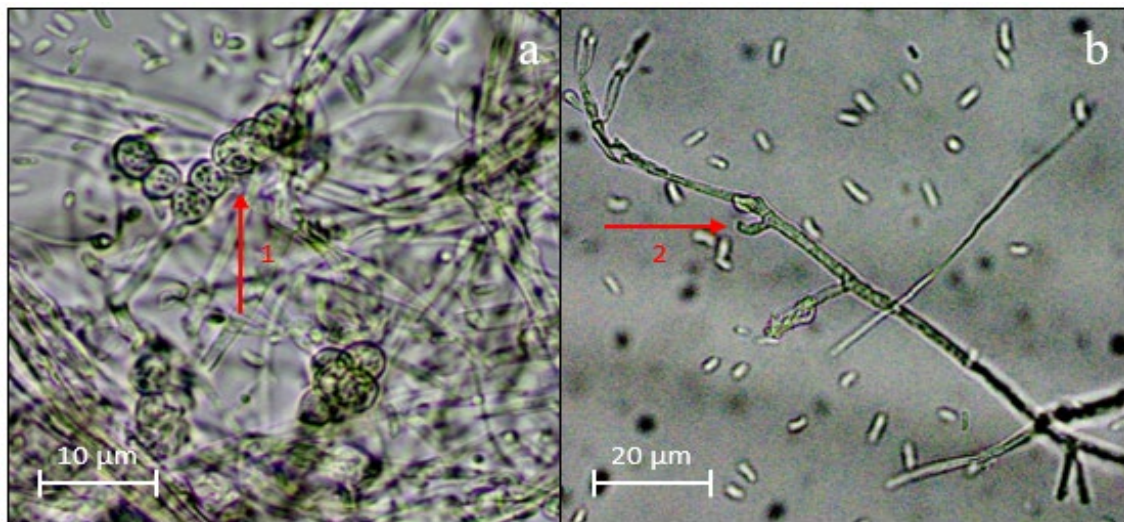


Ilustración 47-4: Características morfológicas de *Fusarium* sp. a) El 1 indica clamidósporas en cadena y en racimo. b) El 2 señala conidiósporos monofialides.

Realizado por: Romero, 2023.

El aislado del morfotipo 86-R3(1), mostró una gran esporulación de clamidosporas con disposición en cadena y en racimos, con un largo de 9 μm x un ancho de 8,5 μm . Adicional conidiosporos monofiálides, estas características coinciden con el género *Fusarium* sp. (Ilustración 47-4).

Tabla 22-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Fusarium* sp.

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color	Color	Tamaño de	
					del anverso	del reverso	espora (μm)	
							L	A
86- R3(1)	Circular y filamentosa	Efusa	Filam entosa	Radial	Crema	Amarill a transpar entosa	9	8,5

Realizado por: Romero, 2023

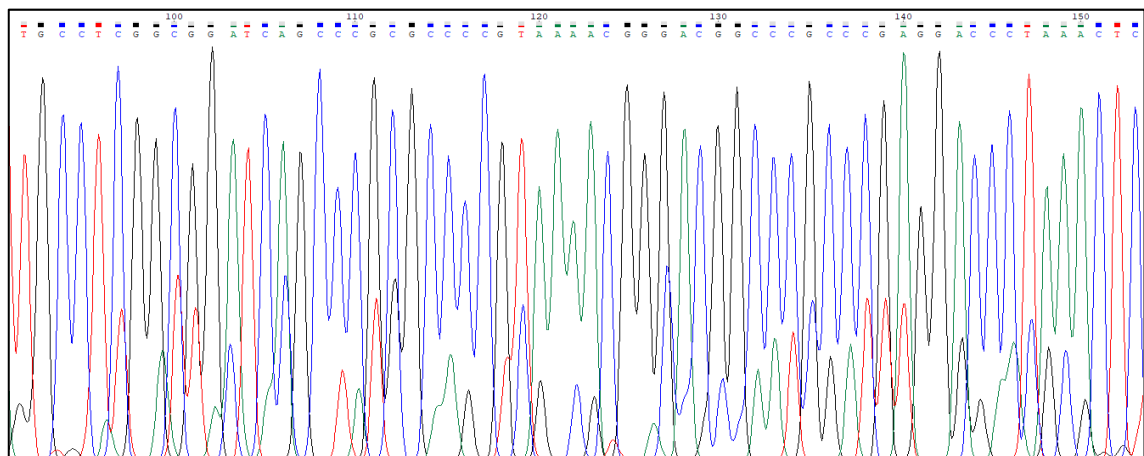


Ilustración 48-4: Cromatograma secuencial de la muestra 86-R3(1): 467, en el programa Chromas 2.6.6.

Realizado por: Romero, 2023.

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por Identificador	Cuenta Len	Adhesión
Fusarium sp. cepa SP32 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña, secuencia parcial: espaciador...	Fusarium sp.	857	857	100%	0.0	99.79%	583	MN428026.1
Fusarium cf. incarnatum-equiseti aislado R2PS(A) gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, sec...	Fusarium cf. en...	857	857	100%	0.0	99.79%	543	MK752405.1
Fusarium incarnatum BTFus06 genes para ITS1_5, 8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, secuencia parcial y com...	Fusarium encar...	857	857	100%	0.0	99.79%	528	LC510358.1
Fusarium sp. aislado SL75_44a_M1 espaciador interno transcrito 1, secuencia parcial: gen de ARN rib...	Fusarium sp.	857	857	100%	0.0	99.79%	520	MN105567.1
Fusarium equiseti voucher PR2 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parcial: esp...	Fusarium equiseti	857	857	100%	0.0	99.79%	547	MK990154.1
Fusarium caatingense cepa URM 6783 espaciador interno transcrito 1, secuencia parcial: gen de AR...	Fusarium caatin...	857	857	100%	0.0	99.79%	501	MH668819.1
aislado de Fusarium chlamydosporum MAR3 ABK gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, sec...	Fusarium chlam...	857	857	100%	0.0	99.79%	547	MK729132.1
Fusarium sp. cepa AC13 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña, secuencia parcial: espaciador...	Fusarium sp.	857	857	100%	0.0	99.79%	540	MH884170.1
Fusarium sp. cepa NRRL 25084 gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial: espaciador interno tran...	Fusarium sp.	857	857	100%	0.0	99.79%	1131	MH582450.1
Fusarium sp. cepa MICMW-32.8b gen de ARN ribosomal 18S, secuencia parcial: espaciador interno tra...	Fusarium sp.	857	857	100%	0.0	99.79%	1122	MG838037.1

Ilustración 49-4: Resultado del análisis Nucleotide Blast: 583.

Realizado por: Romero, 2023.

La caracterización molecular enseñó los siguientes datos: el producto PCR del morfotipo 86-R3(1), comprobó en su cromatograma un tamaño de 467 bp (pares de bases), el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MN428026,1 que corresponde al género *Fusarium* sp. **(Ilustración 48-4) (Ilustración 49-4).**

4.6 Discusiones

La provincia de Imbabura se ubica en el estribo occidental de la cordillera real y la cordillera occidental en la región interandina, según lo establecido por la Subdirección de Planificación Territorial Prefectura de Imbabura (2023, p.18) los cantones: Urcuquí e Ibarra presentan un orden de suelo inceptisol, el cual es el suelo de las regiones subhúmedas y húmedas coincidiendo con los factores climáticos de donde es originaria esta plaga. El MAGAP (2005, pp.05-06) considera al clima de los cantones antes mencionados donde se asientan las plantaciones con la plaga a estudiar: hacienda Pisangacho, parroquia Urcuquí y hacienda La Magdalena, parroquia Angochagua; un clima ecuatorial mesotérmico semi húmedo. La parroquia Angochagua presenta una altura entre los 2 226 - 2 718 m.s.n.m.; mientras que la parroquia Urcuquí presenta una altura entre los 2 800 - 3 800 m.s.n.m.

Estudios realizados por Johansson et al., (2013, p.201) mencionan a la humedad relativa y a la temperatura como factores fundamentales para la proliferación de hongos. Para Dedesko & Siegel (2015, p.02) el crecimiento de los hongos necesita una humedad relativa que no sobrepase el 65 % y una temperatura que no exceda los 16,77 °C para garantizar su comodidad. Datos realizados por el GADM “Urcuquí” (2015, p.404) mencionan las condiciones climáticas de la hacienda Pisangacho con una temperatura entre los 16 - 18 °C coincidiendo con los estudios establecidos por Dedesko & Siegel y una humedad relativa del 50 % siendo un valor alto, pero difiriendo con los factores

climáticos establecidos por Dedesko & Siegel, razón por la que se logró encontrar muestras entomológicas parasitadas. Por otro lado, los datos realizados por el GADM “Ibarra” (2021, p.19) mencionan las condiciones climáticas de la hacienda La Magdalena con una temperatura entre los 8 - 10 °C difiriendo con una temperatura óptima para la proliferación de hongos y una humedad relativa del 66,04 % siendo un valor muy bajo, pero coincidiendo con los estudios hechos por Dedesko & Siegel, razón por la cual no se encontró muestras entomológicas parasitadas.

Los adultos y las larvas de la plaga del Eucalipto nativo de Australia al igual que la plaga presente en las instalaciones de la empresa Novopan del Ecuador S.A., se nutren únicamente del follaje de los árboles de Eucalipto, es notoria la deformación de las copas y la susceptibilidad frente al ataque de otras plagas (Beéche et al., 1999, p.07). Para Russo (2017, p.10), los hongos entomopatógenos son los agentes de control biológico más relevante en todo el mundo y son el centro de intensas investigaciones desde aproximadamente hace 100 años. Registros del trabajo realizado por Khan et al., (2012, p.63), indican el mecanismo del ataque del hongo entomopatógeno representado en tres etapas: 1. Las esporas del hongo se adhieren en la cutícula del insecto, 2. La acción enzimática del hongo en la cutícula del insecto destruye la entrada del tubo germinal de la espora en el cuerpo del insecto y 3. La acción de las toxinas producidas por la espora matan al insecto.

En Ecuador no se han reportado estudios concretos sobre metodologías de aislamientos para la obtención de hongos entomopatógenos asociados a la plaga *Gonipterus* sp., sin embargo, información mencionada por Monzón (2001, p.97) coinciden con el trabajo actual ya que considera los dos tipos de metodología de aislamientos para hongos entomopatógenos: aislamiento por dilución seriada y aislamiento directo. Nuevamente, los resultados del mismo autor coinciden con los resultados de este trabajo, ya que el aislamiento por diluciones seriadas tuvo mayores muestras fúngicas, mientras que el aislamiento directo es una técnica desventajosa debido a que las muestras del insecto pueden estar sucias y contaminar el aislamiento (Monzón, 2001, p.98).

En los resultados de aislamiento por diluciones seriadas las muestras se centrifugaron con solución salina al 0,5 % dando origen a solución madre y dilución 10^{-1} , por cada dilución se realizó tres réplicas en medio PDA e incubadas a 28 °C por un período de 72 horas, coincidiendo con los resultados del estudio de Sosa et al., (2005, p.26), por otro lado, los mismos resultados de solución madre señalaron mayor cantidad de morfotipos mientras que la dilución 10^{-1} indicó menor cantidad de morfotipos. Para este trabajo se consideró los intervalos de confianza al 95 % planteados por Mori et al., (2013, p.55) donde sus resultados en diluciones seriadas: solución madre y dilución 10^{-1} arrojaron valores con significancia estadística y valores sin significancia estadística difiriendo con los resultados de este trabajo, ya que se calculó la diversidad de morfotipos y se consideró la riqueza de especies, índice de Shannon e índice de Simpson donde los resultaron

indicaron que no existió una diferencia significativa entre los rodales según su intervalo de confianza al 95 %.

La plaga del gorgojo en nuestro país representa una grave amenaza para las plantaciones de Eucalipto, se han desarrollado diversas publicaciones en las cuales se destaca el estudio realizado por Echeverri & Santolamazza, citado por Avilés (2019, p.42), donde mencionan que *Beauveria bassiana* es una adecuada opción para el control biológico de esta plaga. Según los sustentos elaborados por Echeverry & Santolamazza (2010, p.297), mostraron a *B. bassiana* como un biocontrol alcanzando el 100 % de mortalidad en los insectos trabajados, además presento mejores resultados a comparación de insecticidas sintéticos. Castellanos (1997, p.66), indican que la patogenicidad del entomopatógeno *B. bassiana* se adhiere sobre los componentes de la cutícula influyendo la infectividad del hongo, sus toxinas indican la gravedad de la enfermedad producida o la capacidad del hongo para matar al insecto.

En el estudio realizado por Castillo et al., (2012, p.278), los resultados de los aislamientos coincidieron con los resultados del actual trabajo, donde los aislamientos de las cepas de *Beauveria bassiana*, fueron cultivados en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) e incubados a 25 °C, por 13 días; presentaron aspectos algodonosos en un inicio y su superficie semielevada con crecimiento moderado se fue pulverizando; las cepas indicaron un color blanco que durante el crecimiento micelial tornandose un color amarillento por la parte reversa de las cajas Petri del presente trabajo. Por otro lado, las observaciones que permitieron caracterizar a las esporas de los aislamientos pertenecientes a la especie *B. bassiana* en base al estudio de Castillo et al., (2012, p.277), fue el promedio de largo y ancho de las esporas de 2,3 - 2,9 x 2,0 – 2,8 µm, que se las caracterizó como globosas, hialinas y lisas, con células conidioforas anchas en la parte basal; los resultados del presente trabajo son levemente diferentes ya que indicaron esporas esféricas levemente ovadas de 2 µm de largo x 2 µm de ancho con la presencia simpodial del conidióforo de donde emergen las esporas. En un estudio realizado por Archuleta (2012, pp.37-38), todas las secuencias de *B. bassiana* depositadas en el GenBank del NCB fueron 99 % homólogas y a pesar de no presentar un 100 % de homología se consideró como *Beauveria bassiana* por su proximidad en su secuencia nucleotídica y sus porcentajes de similitud entre altas secuencias de 94,7 hasta 100 % y con una divergencia de 0 hasta 3,2 %.

Por otro lado, publicaciones de Bajío (2020, p.01), mencionan que *Fusarium* spp. es un género de hongos distribuido por todo el mundo, en el cual varias de sus especies producen enfermedades a humanos y animales debido a la usual contaminación por las micotoxinas producidos por el hongo durante la infección. La contribución del estudio de Mosqueda et al., (2018, pp.28-29), considera a *Fusarium* sp. como un entomopatógeno donde los aislados de este género resultaron hospederos

de las especies: *Melanoplus sp.*, *Toxoptera citricida* y *Spodoptera frugiperda* en cultivos de maíz. Para el proceso de aislamiento se consideró lo establecido por Gómez, agregar 2 µL de esporas sobre cajas con medio PDA e incubarlas a 27 °C en la oscuridad durante 10 días, coincidiendo con los resultados del trabajo actual (Henao et al., 2017, p.04). Las cepas de *Fusarium* revelaron un dato novedoso, ya que indican una alta prevalencia del 83 % de incidencia actuando como entomopatógeno, saprobio o patógeno oportunista (Mosqueda et al., 2018, pp.28-29). Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren con otras investigaciones realizadas con la caracterización de aislados a *Fusarium sp.*, donde mencionan que presentó un micelio aéreo abundante y algodonoso, a veces afelpado, de color blanquecino, con tonalidades rosa violáceo y púrpura, fundamentalmente en el centro de la colonia y una pigmentación variable, con predominio de los colores rosa, violáceo y púrpura en el anverso de la placa, y azul grisáceo-verdoso en el reverso, los caracteres cualitativos y cuantitativos evaluados fueron utilizados mediante la tabla de colores de Rayner en 1970, para el mismo autor los resultados coinciden con la presencia de macroconidias hialinas, de semicurvas o casi rectas a curvadas, tuvieron entre tres y cinco septos de 26,10 - 36,74 x 3,0 - 4,54 µm (Lezcano et al., 2012, pp.190-191). Lo hallado en la investigación de Velarde et al., (2018, pp. 1682-1683) indica que las secuencias de los aislados de *Fusarium sp.* manifestaron una alta similaridad comparada en la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología. Al igual que el estudio ejecutado por O'Donnell et al., citado por Valverde et al., (2018, p.1677) señala al género *Fusarium sp.* con una alta secuenciación conservada, cuyos productos amplificados generan un fragmento de 700 pb, por otro lado, la búsqueda de secuencias de ADN se realizó en programa BLAST donde se compararon las secuencias de nucleótidos en estudio, con las bases de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI).

La publicación de Domsch, citado por Allegrucci et al., (2007, p.85) menciona a la especie *Epicoccum nigrum* como un saprófito encontrado comúnmente en el suelo y restos vegetales. Mientras que, *Alternaria arborescens* es una especie fitopatógena y saprófita con un elevado potencial para la producción de micotoxinas (Broggi, 2003, p.182), estos estudios realizados por diferentes autores rezagan con el actual trabajo ya que este hongo fue hallado en diferentes insectos y no existen hallazgos en los mismos.

Las especies del género *Alternaria* crecen como saprófitos en el suelo y en ciertos sustratos orgánicos, Cruz et al., (2016, p.182) indica que la especie *Alternaria arborescens* se asocia con enfermedades en las plantas. Este hongo sintetiza metabolitos tóxicos en las plantas ocasionando efectos en la salud de personas y animales menciona Pavón et al., (2012, p.1779). En un estudio realizado por Perelló et al., (2015, p.07), señala la coloración de las cepas desde negras, gris oscuro, gris verdoso, gris pálido hasta blancas coincidiendo con la coloración de las cepas de esta

investigación. Cruz et al., (2016, p.183) nuevamente corrobora en su estudio las características morfológicas donde los conidióforos son erectos, cortos, ramificados dicotómicamente con un tamaño de $50 \times 4,5 \mu\text{m}$ de largo y ancho declinando con el actual trabajo. La aplicabilidad del método para la detección de ADN en *Alternaria spp.* amplificó un fragmento de aproximadamente 370 pb, para estos resultados secuenciales cromatográficos fueron depositadas en el GenBank del NCB presentando el 100 % de las muestras, estos resultados difieren con el presente trabajo ya que evalúa productos alimenticios (Pavón et al., 2011, p.244).

Epicoccum nigrum según Bleoju (2007, p.03) es un hongo que se encuentra distribuido y aislado generalmente en el aire, suelo, plantas, animales, considerado como un saprófito. Los resultados de la especie *Epicoccum nigrum* del estudio de De Lima et al., (2012 p.02) al igual que el presente trabajo los cultivos crecieron en medio de cultivo PDA y presentaron un crecimiento micelial aéreo moderado con márgenes irregulares. Según los estudios de Baeck (2020, p.19) los resultados no coinciden con la investigación actual ya que la caracterización cultural indica coloraciones roja-anaranjadas en el halo miceliar, sin tomar en cuenta la consideración de una tabla de coloración. En la caracterización morfológica del género *Epicoccum* las cepas forman conidióforos en esporodoquios y los conidios presentan tamaños de 17 - 26 μm de largo y 12 - 20 μm de ancho (De Lima et al., 2012, p.02). El estudio de Martini et al., (2009, p.996) realiza una amplificación y secuenciación PCR a los aislados de *E. nigrum* coincidiendo con el presente trabajo al utilizar los primers universales ITS1 e ITS4 para la amplificación, pero difirieron con el resultado de amplificación en el cromatograma siendo de 500 a 600 pb, representando el 99 % en el programa GenBank.

Otros estudios con distintos aislados del género *Fusarium sp.* se asemejan al actual trabajo ya que fueron cultivados en medio nutritivo PDA e incubados a 27 °C llegando a cubrir el área total de la caja Petri, presentaron un micelio algodonoso con coloración generalmente pálida o incolora corroborando con las cepas de *Fusarium sp.* del rodal 8 ya que presentan una coloración crema con código (#FFFC5) según la tabla de Pantone (Ulloa, 2011, p.16). Para la caracterización morfológica se tomó en cuenta la investigación realizada por (Macías et al., 2015, p.860), los resultados de su trabajo indicaron que en todas las cepas se observaron monofálides con microconidias en masa y además se detectó la presencia de macroconidias y clamidosporas, coincidiendo con los aislados presentes en esta investigación. En una colección de pudrición de nivel de tallo y bulbo del cultivo de cebolla se tomaron muestras de tejido vegetal para la amplificación y secuenciación de sus aislados con los primers universales ITS1 e ITS4 y se obtuvo una secuencia PCR de 533 pb que presentó 100 % de identidad con *Fusarium sp.* en el programa GenBank (Martínez et al., 2021, p.315).

4.6.1 Análisis de la diversidad fúngica asociada a posibles hongos entomopatógenos en *Gonipterus* sp.

El 35,71 % de los aislados obtenidos en el presente estudio pertenecieron al género *Beauveria* spp. el cual fue aislado con mayor frecuencia. Luego le sigue el género *Fusarium* sp. del rosal 7 con 21,43 %. En menores proporciones aparecieron los aislados de los géneros *Alternaria* spp. con el 14,28 %; *Epicoccum* spp. con el 14,28 %; y *Fusarium* sp. del rodal 8 con 14,28 % (Tabla 23-4).

Tabla 23-4. Porcentaje de hongos entomopatógenos aislados a partir de *Gonipterus* sp., insecto del género *Eucalyptus* en la hacienda Pisangacho, provincia Imbabura.

Hongos entomopatógenos aislados	Número de aislados	Porcentaje	Estadío del insecto
<i>Fusarium</i> sp.	15	21,43%	Insecto
<i>Beauveria bassiana</i>	25	35,71%	Insecto
<i>Alternaria arborescen</i>	10	14,28%	Insecto
<i>Epicocum nigrum</i>	10	14,28%	Insecto
<i>Fusarium</i> sp.	10	14,28%	Insecto

Realizado por: Romero, 2023.

4.6.1.1 Abundancia relativa a nivel de filo

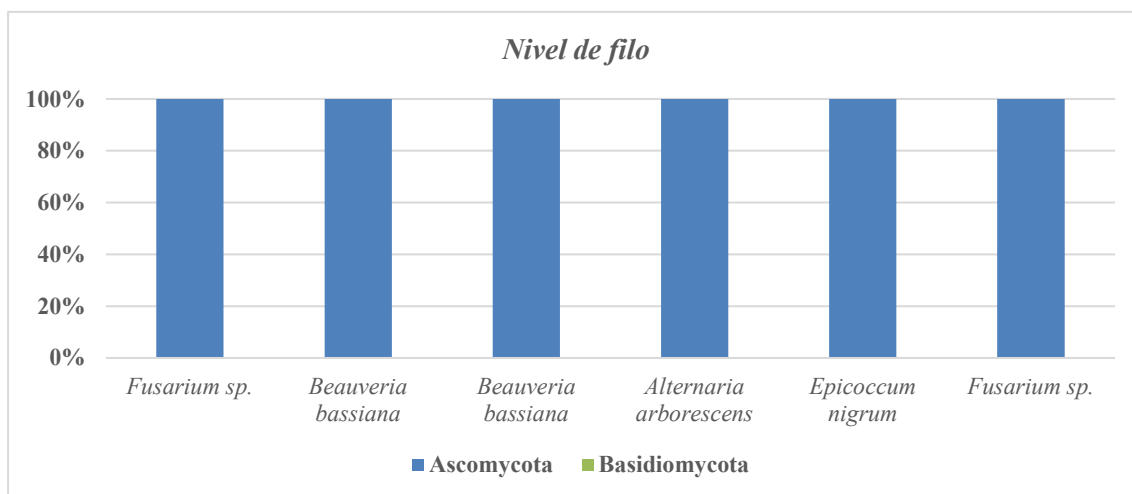


Ilustración 50-4: Abundancia de filo de los posibles hongos entomopatógenos.

Realizado por: Romero, 2023.

El filo fúngico más común en los rodales de la hacienda Pisangacho fue Ascomycota que representó el 100 % (Ilustración 50-4). El filo Ascomycota fue el único que se encontró en el

rodal 7 y rodal 8 de la hacienda Pisangacho de los predios Novopan del Ecuador del sector norte en Imbabura.

4.6.1.2 Abundancia relativa a nivel de género

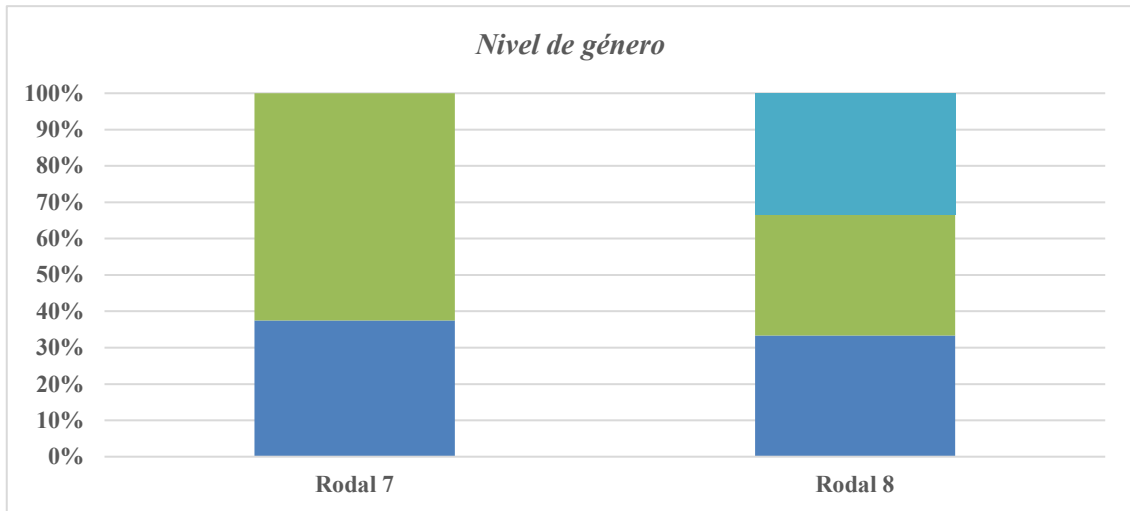


Ilustración 51-4: Abundancia de género de los posibles hongos entomopatógenos.

Realizado por: Romero, 2023.

La composición microbiana fúngica a nivel de género de los aislados asociados a la plaga *Gonipterus* sp. que se observan en el (**Gráfico 51-4**) de abundancia relativa, nos mostró que existen diversos perfiles de composición fúngica. El rodal 7 indicó a *Fusarium* sp. con (37,5 %) y a *Baeuveria* spp. con (62,5 %), mientras que el rodal 8 señaló a *Alternaria* spp. con (33,3 %), *Epicoccum* spp. con (33,3 %) y *Fusarium* sp. con (33,33 %); todos pertenecientes a la hacienda Pisangacho de los predios Novopan del Ecuador del sector norte en Imbabura.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Entre las metodologías planteadas, la mejor metodología fue la de aislamiento por diluciones seriadas con un total de 611 hongos, mientras que la metodología por aislamiento directo tuvo un total de 6 hongos.

Se aislaron 6 hongos, siendo estos: *Fusarium* sp., *Beauveria bassiana*, *Beauveria bassiana*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria arborescens*, y *Fusarium* sp. Únicamente los dos aislados de *Beauveria Bassiana* han sido reportados como controladores de la plaga *Gonipterus* sp., mientras que los dos aislados de *Fusarium* sp., un aislado de *Epicoccum nigrum* y un aislado de *Alternaria arborescens* han sido reportados como saprófitos.

5.2 Recomendaciones

Utilizar todos los estadios del insecto plaga y usar las mismas metodologías de aislamiento de entomopatógenos propuestas en este estudio.

Probar otras metodologías para identificar a nivel de especie los tres hongos que no se pudieron identificar.

Inocular los seis potenciales hongos encontrados en el presente estudio en diferentes estadios de *Gonipterus* sp.

GLOSARIO

Aislamiento: Consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, el hongo aislado debe estar libre de contaminantes y tener buen vigor para su crecimiento (Monzón, 2001, p.97).

Blastoconidio: Posee una estructura de reproducción asexual que se origina por gemación en los hongos blastomicetales, conocidos como levaduras no esporógenas. Cuando se crean las gemaciones de manera repetida se forman cadenas separadas por septos (Mendoza, 2005, p.106).

Cepa: Grupo de microorganismos con ciertas características que no se encuentran en otras especies (Chávez et al., 2014, p.49).

Clamidóspora: Es un tipo de espora asexual cuya pared es gruesa y está formada a partir de células hifales o por la transformación de células conidiales que funciona como etapa de hibernación (D'Arcy et al., 2001, p.01).

Colonia: Es la multiplicación de un microorganismo sobre la superficie de un medio sólido que puede observarse a simple vista (Vargas & Kuno, 2014, p.2594).

Conidio: Es un tipo de espora asexual que generalmente produce elementos de propagación o propágulas e incluso es posible su reproducción por fragmentos de micelio (Sánchez et al., 2017, p.15).

Conidióforo: Es una estructura especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios (Arias et al., 2015, pp. 88-89).

Conidiósporo: Son estructuras que se generan a partir del conidióforo (Silva, 2025, p.12).

Esporangio: Es un tipo de leptosporangio de pedicelos largos de una o dos filas de células, los anillos de los esporangios muestran paredes secundarias con engrosamientos en forma de “U” ricos en lignina (Rincón et al., 2020, p.665).

Esporas: Son fuentes de inóculo que infectan a sus hospederos, estas pueden adherirse o pasar de un hospedero a otro por diferente dispersión (Berretta, 2001, p.10).

Hongo entomopatógeno: Son de suma importancia dentro de los ecosistemas por su alta capacidad natural para regular las poblaciones de insectos plaga, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno-hospedero (Téllez et al., 2009, p.78).

Hongo saprófito: Se encuentra y se alimenta de la materia orgánica en descomposición, puede ser potencialmente patogénico y capaz de reducir la viabilidad de poblaciones (Mendoza et al., 2012: p.33).

Hongo fitopatógeno: Es aquel que enferma a las plantas, su gran impacto destruye plantaciones y cultivos ocasionando pérdidas (García, 2019, p.03).

Inoculación: Significa introducir algo que crecerá y se reproducirá, los métodos de inoculación permiten grandes infecciones en los hospederos (Ortega et al., 2010, p.13).

Macroconidia: Tiene forma y tamaño variable con aspecto de cigarro, a veces curvadas en el extremo y multiseptadas con 2 - 6 células con pared lisa y fina (Mazón & Rodríguez, 2021, p.04).

Microconidias: Nacen sésiles e individualmente en ángulo recto de las hifas terminales engrosadas, en forma: ramificada, ovoide, piriforme, de clava, de lágrima o de conidióforos cortos (Mazón & Rodríguez, 2021, p.03).

Monofiálide: También consideradas células conidiógenas, nacen de hifas y a veces pueden ser: ramificadas, alargadas, laterales, finas, cortas y anchas (Sierra et al., 2022, p.344).

PCR: La Reacción de Cadena Polimerasa es una de las herramientas de la tecnología más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos (Tamay et al., 2013, p.70).

Plaga: Población de insectos que ataca a las plantaciones o cultivos establecidos por seres humanos y cuyo nivel poblacional sube hasta producir una reducción, anulación del rendimiento de la plantación o cultivo y pérdidas económicas (Jiménez et al., 2009, p.13).

Septos: Las hifas de los hongos están divididas en células por paredes internas llamadas septos (Menéndez, 2014, p.01).

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA SOLIS, M. *El Eucalipto en Ecuador*. 2da Edición. Quito-Ecuador: Editorial “Ecuador”, 1949, pp. 01-51.

ALLEGRUCCI, Natalia; ELÍADES, Lorena; BUCSINSZKY, Ana; CABELLO, Marta; & ARAMBARRI, Angélica. “Diversidad de anamorfos de *Ascomycota* en bosques nativos de *Celtis tala* (Ulmaceae) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina”. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* [en línea], 2007, (Argentina), 42(1-2), pp. 79-86. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 0373-580X. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/bsab/v42n1-2/v42n1-2a11.pdf>

ARCHULETA TORRES, Arely. Caracterización morfológica y molecular de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliade* (Metsch.) Sorokin de suelos cultivados y no impactados en el norte de Sinaloa (Trabajo de titulación). (Maestría) Instituto Politécnico Nacional, Departamento de biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. México. 2012. pp. 01-66.

ARIAS MOTA, Rosa; HEREDIA ABARCA, María; & CASTAÑEDA RUIZ, Rafael. “Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos conidiales saprobios del bosque mesófilo de montaña del estado de Veracruz IV”. *Acta botanica mexicana*, vol. 113 (2015) pp. 87-101.

AVILÉS RAMOS, Ana Belén. Posible amenaza del complejo *Gonipterus scutellatus* Gylenhall (1833) sobre las especies de *Eucalyptus* L'Hér (1789), debido a su introducción a Ecuador (Trabajo de titulación). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas. (Quito). 2019. pp. 01-79.

BAADII, M.; FLORES, A.; & GALÁN, L. “Reseña de fundamentos y perspectivas del control biológico”. *Ciencia UANL*, vol. 04, n° 02 (2000), (México) pp. 226-228.

BADII, Mohammad; FLORES, Adriana; PONCE, Gustavo; QUIROZ, Humberto; GARCÍA, Juan; & FOROUGHBAKHCH, Rahim. “Formas de Evaluar los Enemigos Naturales en Control Biológico”. *CULCyT*, vol. 1, n° 2 (2004), (México) pp. 03-11.

BAECK, Camila. Efecto antagónico del hongo *Epicoccum nigrum* y del extracto de ajo frente a la micoflora del grano de trigo candeal asociada al manchado. Su potencial empleo como biofungicidas. (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, La Plata-Argentina. 2020. pp. 01-45.

BARROS, Santiago. “El género *Eucalyptus*”. *Ciencia e Investigación Forestal INFOR Chile*, vol. 18, n° 3 (2012), (Chile) pp. 75-100.

BEÉCHE, Marcos; SANDOVAL, Ariel; ROTHMANN, Sergio; RAVANALES, Juan; CERECEDA, Consuelo; MUÑOZ, Raquel; OLOVERA, Gema; CORVALAN, Lister; GALARCE, Graciela; SAN MARTIN, Alejandro. *Detección y control del gorgojo del eucalipto *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal en Chile (Coleoptera: Curculionidae)*. Santiago-Chile: SAG Chile, 1999, pp. 01-43.

BEEVER, R.; & BOLLARD, E. “The Nature of the Stimulation of Fungal Growth by Potato Extract”. *Microbiology society*, vol. 60, n° 2 (1970), (Great Britain) pp. 273-279.

BERRETTA, Marcelo. Dos nuevos genes de *Beauveria bassiana*: Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, Buenos Aires-Argentina. 2001. pp. 01-107.

BLEOJU, Mihaela. Estudio de estabilidad y algunas propiedades tecnológicas de pigmentos sintetizados por *Epicoccum nigrum* (Trabajo de titulación). (Maestría). Universidad de Burgos, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Burgos-España. 2007. pp. 01-20.

BROGGI, Leticia. Productos agrícolas de la provincia de Entre Ríos: contaminación potencial por mohos y micotoxinas e influencia de los procesos de molienda regional (Trabajo de titulación). (Doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires-Argentina. 2003. pp. 01-232.

CABALLERO, Wendy. Producción y aplicación del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del ITZM (Trabajo de titulación). Instituto Tecnológico de la Zona Maya, Carrera Ingeniería Forestal, México. 2014. pp. 01-33.

CARBAJAL, Adriana; SÁNCHEZ, Miriam; & ROMERO, Eric. “Bioplaguicidas: un sustituto de los plaguicidas químicos”. *RD-ICUAP*, vol. 5, n° 13 (2019), (México) pp.01-16.

CÁRDENAS, Elizabeth; & CORREA, Rodrigo. “Importancia de los árboles en la planificación de Quito, Ecuador”. *Paranoá 30*, vol. 15, n° 30 (2021), (Brasil) pp. 01-18.

CASTELLANOS DOMINGUEZ, Oscar Fernando. “Importance of the enzymatic action of *Beauveria bassiana* on its pathogenicity toward the reel”. *Revista colombiana de entomología*, vol. 22, n° 1-2 (1997), (Colombia) pp. 65-71.

CASTILLO, Carmen; CAÑIZALEZ, Luis; VALERA, Rafael; GODOY, Jean Carlos; GUEDEZ, Clemencia; OLIVAR, Rafael; & MORILLO, Solbey. “Morphological characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from different insects in Trujillo state, Venezuela”. *Revista ACADEMIA* [en línea], 2012, (Venezuela) 6(23), pp. 275-281. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1690-3226. Disponible en: <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/academia/v11n23/art08.pdf>

CHÁVEZ, Georgina; MAMANI, Marisel; ESPINAL, Cristhian; TENORIO, Reynaldo; CRESPO, Carla; & ALVAREZ, María. “Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica”. *Revista con ciencia*, vol. 2, n° 1 (2014), (Bolivia) pp. 47-54.

CISNEROS, Fausto. *El manejo integrado de plagas*. Lima-Perú: Unidad de Comunicación, CIP. ISBN (XX-TR-S-04-O-600), pp. 01-38.

CRUZ, Iván. *Uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/488624/1/Usohongos.pdf>

CRUZ, Rodrigo; PIONTELLI, Eduardo; VIEILLE, Peggy; & CARVAJAL, Laura. “Identification of *Alternaria botrytis* (Preuss) Woudenberg & Crous”. *Revista Argentina de microbiología*, vol. 48, n° 2 (2016), (Argentina) pp. 182-183.

D'ARCY, C. J.; EASTBURN, D. M.; & SCHUMANN, G. L. *Illustrated Glossary of Plant Pathology* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/default.aspx>

DÁVILA GUERRA, Kevin. Eficacia de la aplicación líquida y sólida del hongo *Beauveria bassiana* para el control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y del picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) en condiciones de laboratorio y campo (Trabajo de titulación). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera Ingeniería Agronómica. Quevedo-Ecuador. 2020. pp. 01-78.

ECHEVERRÍA, Fabián. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin (Trabajo de titulación). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago-Costa Rica. 2006. pp. 01-92.

ECHEVERRI MOLINA, Derian, & SANTOLAMAZZA CARBONE, Serena. “Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae)”. *Springer* [en línea], 2010, (South África) 83(3), pp. 297–305. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1612-4758. Disponible en: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/J.PestSciVol83pp297-3052010.pdf>

DEDESKO, Sandra; & SIEGEL, Jeffrey. “Moisture parameters and fungal communities associated with gypsum drywall in buildings”. *Microbiome*, vol. 3, n° 71 (2015), (Canadá) pp.01-15.

DE LIMA, Leía; DE SOUZA, Fernanda; ARAÚJO Wellington. “*Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth”. *Plos one*, vol. 7, n° 6 (2012), (Brasil) pp. 07-10.

EL COMERCIO. *El Eucalipto genera impactos sobre la naturaleza* [Consulta:01 noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/sociedad/eucalipto-impactos-naturaleza-incendios-fuego.html>

ESTAY, S.; ARAYA, J.; & GUERRERO, M. “Biología de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en San Felipe, Chile”. *Sanidad Vegetal*, vol 28, (2002), (Chile) pp. 391-397).

FAO. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001* [blog]. Roma: Grupo Editorial Dirección de Información de la FAO, 2021. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/x9800s/x9800s16.htm>

FAO. “Principales plagas y enfermedades del eucalipto fuera de Australia”. *Unasyuva*, vol. 12, n° 2 (1958), (Brasil) p. 01.

FERNÁNDEZ ANDREU, Manuel; DÍAZ SUÁREZ, Luis; ILLNAIT ZARAGOZÍ, María; ARAGONÉS LÓPEZ, Carlos; MARTÍNEZ MACHÍN, Gerardo; PERURENA LANCHA, Mayda; & RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Iraida. “Preservation of fungal cultures of medical importance in distilled water”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, vol. 65, n° 3 (2013), (Cuba) 65(3) pp. 361-369.

FRANCE, Andrés; CISTERNAS, Ernesto; & URTUBIA, Irina. *Hongos entomopatógenos microorganismos benéficos para el control de A. nodipennis* [blog]. Chile: INIA La Cruz, 2016. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://web.inia.cl/wp-content/uploads/2016/10/Bolet%C3%ADn34-A%C3%B1o-2016-ultimo-Hongos-entomopat%C3%B3genos.-Microorganismos-ben%C3%A9ficos-para-el-control-de-A.-nodipennis.pdf>

FRANCO, L. *Observación de hongos de interés industrial* [en línea]. Granada-España: Universidad de Granada, 2015. pp. 07-13. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~cjl/hongos>

GARCÍA, Jhon. *Clasificación científica Eucalipto* [blog]. [Consulta: 01 noviembre]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/233378524/Clasificacion-cientifica-eucalipto#>

GARCÍA ROMERO, Ibonne Aydee. “Genomic of phytopathogenic fungi as tool to develop of manage strategy”. *Revista colombiana de biotecnología*, vol. 21, n° 2 (2019), (Colombia) pp. 03-05.

GARCÍA SAFE, Diego Raúl. *Preferencia de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) por hojas de distintas especies de Eucalipto* (Trabajo de titulación). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales, Escuela de Ciencias Forestales, Chile. 2008. pp. 01-45.

GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO MUNICIPAL URCUQUÍ. “Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2014-2015” [en línea], 2015. Disponible en: https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1060000770001_1060000770001_Urcuqu%C3%AD%20PD%20y%20OT%202016_14-04_14-04-2016_07-29-58.pdf

GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO MUNICIPAL IBARRA “Plan de Desarrollo y Orenamiento Territorial 2019-2023” [en línea], 2021. Disponible en: <https://www.ibarra.gob.ec/site/docs/lotaip2021/anexos/s/PDOT%202020-2040%20CANTON%20SAN%20MIGUEL%20DE%20IBARRA.pdf>

GONZÁLEZ, Alejandro; SAVORNIN Pilar; & AMARAL, Laura. *Control biológico del *Gonipterus scutellatus* por *Anaphes nitens* en Uruguay* [blog]. Uruguay: 2010. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12555/1/SAD629p2532.pdf>

GRANADOS SÁNCHEZ, D.; & LÓPEZ RÍOS, G. “Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*”. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol. 13, n° 2 (2006), (México) pp. 143-156.

GUMOVSKY, Alex; LITTE, Dave; ROTHMANN, Sergio; JAQUES, Lorena; IDE, Sandra. “Re-description and first host and biology records of *Entedon magnificus* (Girault & Dodd) (Hymenoptera, Eulophidae), a natural enemy of *Gonipterus weevils* (Coleoptera, Curculionidae), a pest of *Eucalyptus* trees”. *Zootaxa* [en línea], 2015, (Australia) 3957 (5), pp. 577-584. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1175-5326. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Alex-Gumovsky/publication/280869290_Re-description_and_first_host_and_biology_records_of_Entedon_magnificus_Girault_Dodd_Hymenoptera_Eulophidae_a_natural_enemy_of_Gonipterus_weevils_Coleoptera_Curculionidae_a_pest_of_Eucalyptus_trees/links/55f6eccc08aeb1d9eed9fa5/Re-description-and-first-host-and-biology-records-of-Entedon-magnificus-Girault-Dodd-Hymenoptera-Eulophidae-a-natural-enemy-of-Gonipterus-weevils-Coleoptera-Curculionidae-a-pest-of-Eucalyptus-tr.pdf

HAY, Ashley. *Book Review: Gum the story of eucalypts and their champions by Ashley Hay* [blog]. *Review by the NPA's Environmental Book Group*, 2021. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://npansw.org.au/2022/05/31/book-review-gum-the-story-of-eucalypts-and-their-champions-by-ashley-hay/>

HENAO HENAO, Edwin David; HERNÁNDEZ MEDINA, Carlos Alberto; SALAZAR GONZÁLEZ, Claudia; VELASCO BELALCAZAR, Martha Lucia; GÓMEZ LÓPEZ, Eyder Daniel. “Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia”. *Agronomía Mesoamericana* [en línea], 2017, (Costa Rica) 29(1),

pp. 01-10. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1021-7444. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v29n1/1659-1321-am-29-01-00056.pdf>

HERNÁNDEZ, Manuel; CERVANTES, Zito; VILLALOBOS, Francisco; GARCÍA, Laura; & PEÑA, Guadalupe. “Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (*Coleoptera: Melolonthidae*) en agroecosistemas de maíz”. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* [en línea], 2011, (México) 27(3), pp. 591-599. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 0065-1737. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065-17372011000300007&script=sci_arttext

HUERTA FUENTES, Amanda; CHIFFELLE GÓMEZ, Ítalo; SERRANO GARZÓN, Maryi; VÁZQUEZ SILVA, Tatiana; & ARAYA CLERICUS, Jaime. “Susceptibilidad de especies de eucalipto a *Gonipterus scutellatus* y perfiles electroforéticos de proteínas marcadoras del adulto”. *Agrociencia*, vol. 42, n° 3 (2008), (Chile) pp. 327-334.

INABIO (Instituto Nacional de la Biodiversidad). *Se registra por primera vez en Ecuador la presencia de microavispa parasitoide del gorgojo del Eucalipto* [blog]. Ecuador: 2023. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <http://inabio.biodiversidad.gob.ec/2023/05/11/se-registra-por-primera-vez-en-ecuador-la-presencia-de-microavispa-parasitoide-del-gorgojo-del-eucalipto/#:~:text=El%20gorgojo%20del%20eucalipto%20Gonipterus,vez%20en%20el%20a%C3%B1o%202019.>

INTAGRI. *Los Entomopatógenos, Control Biológico de Plagas* [blog]. México: Instituto para Innovación Tecnológica en la Agricultura, 2021. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/64.%20Los%20Entomopatogenos%20Control%20Biologico%20de%20Plagas.pdf>

ITURRE, Marta; & DARCHUCK, Elizabeth. “Record of Scolitidae species related to the genus *Eucalyptus* in Santiago del Estero”. *Quebracho*, n° 4 (1995), (Argentina) pp. 11-16.

JENSEN, Annette; MEYLING, Nicolai; & EILENBERG, Jorgen. “Insect pathogenic fungi in biological control: Status and future challenges”. *IOBC/wprs Bulletin*, vol. 45 (2009), (Denmark) pp. 07-10.

JIMÉNEZ, Edgardo; SANDINO, Víctor; & VALLE, Nicolás. *Métodos de control de plaga* [en línea] (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

2009. pp. 01-141 [Consulta: 01 noviembre de 2022]. Disponible: <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10J61me.pdf>

JOHANSSON, Pernilla; SVENSSON, Thomas; & EKSTRAND, Annika. “Validation of critical moisture conditions for mould growth on building materials”. *Building and Environment*, vol. 62 (2013), (Sweden) pp. 201-209.

KHAN, Sehronn; GUO, Lihua; MAIMAITI, Yushanjiang; MIJIT, Mahmut; & QIU, Dewen. “Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent”. *Biopublisher*, vol. 3, n° 7 (2012), (China) pp. 63-79.

LEÓN ORTEGA, Henry Eddy. *Caracterización del bosque de Eucalyptus globulus de la hacienda El Prado* (Trabajo de titulación). Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Ciencias Agropecuarias. Ecuador. 2006. pp. 01-112.

LEZCANO, J.; MARTÍNEZ, B.; ALONSO, O. “Cultural and morphological characterization and identification of ten *Fusarium* isolates from stored *Leucaena leucocephala* cv. Peru seeds”. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, vol. 35, n°2 (2012), (Cuba) pp. 187-196. Disponible en: [file:///C:/Users/DELL/Downloads/269125071006%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/DELL/Downloads/269125071006%20(2).pdf)

LIZARDO, Cristian. *Manejo integrado de broca del café* [blog]. Honduras: Instituto Hondureño del Café, 2016. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/cristianlizard/manejo-integrado-de-broca-del-cafe>

LUZAR, Jeffrey. “The Political Ecology of a “Forest Transition”: Eucalyptus forestry in the gern Peruvian Andes”. *Ethnobotany Research & Applications*, vol. 5 (2007), (Peru) pp. 85-93. Disponible en: <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/121/107>

MACÍAS, Sergio; CUEVAS, Andrea; FERNÁNDEZ, Andrea; HUITRÓN, María; CORTÉS, Juan; & DELGADO Francisco. *Aislamiento e identificación de Fusarium sp. a partir de planta de melón injertada en el municipio de Colima, Col* [en línea]. Colima: Academia Journals en Tecnologías, 2015. ISBN 9781939982179. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible: https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Delgado-Virgen/publication/283723801_Aislamiento_e_identificacion_de_Fusarium_sp_a_partir_de_planta_de_melon_injertada_en_el_municipio_de_Colima_Col/links/564565e108ae9f9c13e5d5e3/

Aislamiento-e-identificacion-de-Fusarium-sp-a-partir-de-planta-de-melon-injertada-en-el-municipio-de-Colima-Col.pdf

MANSILLA, J. “Presencia sobre *Eucalyptus globulus* Labill de *Gonipterus scutellatus* Gyll. (Col. Curculionidae) en Galicia”. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, vol. 18 (1942), (Galicia) pp. 547-554.

MAPONDERA, Tendai; BURGESS, Treena; MATSUKI, Mamoru; & OBERPRIELER, Rolf. “Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). *Australian Journal of Entomology*, vol. 51 (2012), (Australia) pp. 175–188.

MARELL, Carlos. “El gorgojo de los Eucalipotos hallados en la Argentina”. *Revista del Museo de La Plata*, vol. 30 (1927), (Argentina) pp. 258-269.

MARTÍNEZ, Saira; ANDRADE, Petra; & ROMERO, Omar. “In vitro control of *Fusarium* sp. associated with onion crop through *Trichoderma harzianum*”. *Mexican Journal of Phytopathology*, vol. 39, n°2 (2021), (México) pp.314-328.

MARTINI, M.; MUSETTI, R.; GRISAN, S.; POLIZZOTTO, R.; BORSELLI, S.; PAVAN, F.; & OSLER, R. “DNA-Dependent detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pululanos* and *Epicoccum nigrum*”. *The American Phytopathological Society*, vol.93, n° 10 (2009) (Italia) pp. 993-998.

MARUCE, Mónica; & APRE, Alberto. *Enfermedades forestales. Generalidades* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/20946/mod_resource/content/1/2011Enfermedades%20forestales.%20Generalidades..pdf

MAZÓN, Araceli; & RODRÍGUEZ, Juan. *Trichophyton tonsurans* [blog]. España:2021. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/trtons.pdf>

MELGAR, Mario; MENESES, Adlai; OROZCO, Héctor; PÉREZ, Ovidio; & ESPINOSA, Rodolfo. *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*. Guatemala: Librerías Artemis Edinter, S.A. ISBN (978-9929-40-469-4), pp. 01-512.

MENDOZA, Angela; AGUIRRE, Lina; SARRIA, Maryory; GIRALDO, Alan. “Hongos dérmico saprófitos de *Dendropsophus columbianus* (Hylidae) en Caloto, Colombia”. *Boletín científico centro de museos museo de historia natural* [en línea], 2012, (Colombia) 16(1), pp. 33-40. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 0123 – 3068. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v16n1/v16n1a03.pdf>

MENDOZA, Jorge; GÓMEZ, Patricia; & Gualle, Darío. *Posibilidades del uso de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae para el control del picudo rayado, Metamasius hemipterus, en caña de azúcar* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Posib.-uso-B.-bassiana-para-Metamasius.pdf>

MENDOZA, Mireya. “Importancia de la identificación de levaduras”. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 25, n° 1 (2005), (Venezuela), pp. 103-117.

MENÉNDEZ, Juan. *Características generales de los hongos* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/temarios/biologia/hongos/caracteristicas-generales>

MEYLING, Nicolai; & EILENBERG, Jorgen. “Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control”. *Biological Control*, vol. 43 (2007), (Denmark) pp. 145–155.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA ACUACULTURA Y PESCA. “Método del estudio geopedológico: Proyecto de levantamiento de cartografía temática a escala 1:25.000, lotes 1 y 2” [en línea], 2015. Disponible en: http://metadatos.sigtierras.gob.ec/pdf/Metodologia_Geopedologia_16122015.pdf

MORI, Teresa; RUIZ, Edith; GARCÍA, Mildred; BARDALES, Julia; AYALA, Álvaro; BENDAYÁN, María; ESPINOZA, Freddy; DÁVILA, Carlos; ÁNGULO, Jorge; Reátegui, Ricardo; ZAPATA, Eliseo; & ARÉVALO, Leonor. “Antimicrobial effects of *Myrciaria dubia* (camu camu) and *Cyperus luzulae* (piri piri) on pathogenic microorganisms”. *Conoc. Amaz*, vol. 4, n° 1 (2013) pp. 49-57.

MOSQUEDA, Joel; LANDEROS, Jaime; RAMÍREZ, Baltazar; SANTIAGO, Miguel; VERGARA, Santiago; CERVANTES, José; ESQUIVEL Edgardo. “Hongos asociados a

cadáveres de insectos plaga en el estado de Querétaro, México”. *Scientia Fungorum*, vol. 47, (2018), (México) pp. 25-35.

MOTTA DELGADO, Pablo; & MURCIA ORDOÑEZ, Betselene. “Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas”. *Revista Ambiente e Agua*, vol. 6, n° 2 (2011), (Brasil) pp. 77-90.

MOZÓN, Arnulfo. “Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua”. *Manejo Integrado de Plagas*, n°63 (2001), (Costa Rica) pp. 95-103.

NOBOA GUERRA, Gisela; & QUELAL GUERRERO, 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). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Carrera Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito-Ecuador. 2015. pp. 01-120.

OP DE BEECK, Michiel; LIEVENS, Bart; BUSSCHAERT, Pieter; DECLERCK, Stephan; VANGRONSVELD, Jaco; & COLPAERT, Jan. “Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies”. *Ploss one*, vol. 9, n° 6 (2014), (Belgium) pp. 01-11.

ORTEGA CENTENO, S.; Guillén Sánchez, D.; RAMOS GARCÍA, M.; TRONCOSO ROJAS, R.; VILLANUEVA ARCE, R.; BOSQUEZ MOLINA, E.; BARRERA NECHA, L.; & BAUTISTA BAÑOS, S. “Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia *Brassicaceae* en el control de la roya del gladiolo”. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, vol. 12, n° 1 (2010), (México) pp. 13-21.

PACHECO HERNÁNDEZ, Lourdes; RESÉNDIZ MARTÍNEZ, Francisco; & ARRIOLA PADILLA, Víctor. “Entomopathogenic organisms for pest control in the mexican agriculture, livestock and forest sectors: a review”. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, vol. 10, n° 56 (2019), (México) pp. 04-32.

PAVÓN, M.; GONZÁLEZ, A.; DE SANTOS, Martín; & GARCÍA, T. “Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas”. *Nutrición hospitalaria*, vol. 27, n° 6 (2012), (España) pp. 1772-1781.

PAVÓN, Miguel Ángel; GONZÁLEZ, Isabel; ROJAS, María; PEGELS, Nicolette; ROSARIO Martín; & GARCÍA, Teresa. “PCR Detection of *Alternaria spp.* in Processed Foods, Based on the Internal Transcribed Spacer Genetic Marker”. *Journal of Food Protection*, vol. 74, n° 2 (2011), (Spain) pp. 240-247.

PERELLÓ, Analía; AULICINO, Mónica; MARTINELLI, Clara; REGUEIRA, Melina; MORENO, Virginia; STENGLEIN, Sebastián. “Morphocultural characterization of *Alternaria* species-groups asociated to wheat diseases in Argentina”. *Revista de ciencias morfológica*, vol. 17, n° 1 (2015), (Argentina) pp. 01-15.

PENÓN, E.; COSTA, M.; BARAÑAO, J.; CRAIG, E.; GAITÁN, J.; CUCCIUFFO, E.; LOPEZ, G.; & RODRÍGUEZ, J. “Modelos de crecimiento de *Eucalyptus globulus* a partir de las propiedades del suelo (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Luján, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2019. pp. 01-10.

PÉREZ, Nilda; & VÁZQUEZ, Luis. *Manejo ecológico de plagas. Transformando el campo cubano. Avances de la Agricultura Sostenible* [en línea]. Ed: ACTAF. La Habana-Cuba: 2001. [Consulta: 01 noviembre 2021]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Luis-Vazquez50/publication/286626657_Perez_N_Y_L_L_Vazquez_Manejo_ecologico_de_plagas_En_Transformando_el_campo_cubano_Avances_de_la_Agricultura_Sostenible_Ed_ACTAF_La_Habana_Pp_191-223_2001/links/566cca2d08ae1a797e3db095/Perez-N-Y-L-L-Vazquez-Manejo-ecologico-de-plagas-En-Transformando-el-campo-cubano-Avances-de-la-Agricultura-Sostenible-Ed-ACTAF-La-Habana-Pp-191-223-2001.pdf

PINTO, J. *Micología: Microbiología ambiental* [en línea]. Guatemala: Universidad de Galileo, 2017, pp. 01-15. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>

PUCHETA DIAZ, Micaela; FLORES MACIAS, Antonio; RODRIGUEZ NAVARRO, Silvia; & DE LA TORRE, Mayra. “Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos”. *INCI* [online], vol. 31, n°12 (2006), (Venezuela) pp. 856-860.

REID, James; & POTTS, Bradley. “Tasmania’s Eucalypts: Their place in science”. *Royal Society of Tasmania*, vol. 137 (2003), (Australia) pp. 21-37.

RINCÓN, Edgar; GUERRA, Beatriz; SANDOVAL, Adriana; & ESPINOSA, Silvia. “Ontogenia de los esporangios y esporogénesis del helecho *Phymatosorus scolopendria* (*Polypodiaceae*)”. *Revista de Biología Tropical*, vol. 68, n° 2 (2020), (Colombia) pp. 655-668.

RODAS, M.; & MADRIGAL, A. Alerta Fitosanitaria ICA [blog]. Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario, 2016. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://vuf.minagricultura.gov.co/PublishingImages/afica.pdf>

RODRÍGUEZ DÍAZ, Eveling. Caracterización morfo-cultural e identificación molecular de comunidades bacterianas de la cuenca hidrográfica “El Carmen”-Loja [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Loja, Ecuador, Área agropecuaria y de recursos naturales renovables, Ingeniería en manejo y conservación del medio ambiente, Ecuador. 2016. pp. 01-77. [Consulta: 01 de noviembre 2022]. Disponible en: https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/9902/1/TESIS_Eveling.Rodr%C3%ADguez.pdf

RUSSO, María. Hongos entomopatógenos: colonización endofítica y control de insectos plaga en cultivos agrícolas (Trabajo de titulación) (Doctoral). Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Argentina. 2017. pp. 01-184.

SALAZAR, Jefferson; MARIÑO, Adriana; ESPINOZA, Jorge; DOMÍNGUEZ, Mariela; & PRUNA, Washington. “Primer registro de *Anaphes nitens* (Hymenoptera: *Mymaridae*) parasitoide de *Gonipterus spp.* (Coleoptera: *Curculionidae*) en Ecuador”. *Revista Científica Ecuatoriana*, vol. 9, n° 2 (2023), (Ecuador) pp. 01-06.

SÁNCHEZ CONTRERAS, María; GONZÁLEZ FLORES, Tania; AYORA TALAVERA, Teresa; EVANGELISTA MARTÍNEZ, Zahaed; & PACHECO LÓPEZ, Neith. “¿Qué son los microbios?”. *Ciencia*, vol. 68, n° 2 (2017), (México) pp. 10-17.

SANMIGUEL CHIMBO, Josue David. Caracterización de microorganismos fúngicos asociados a los frutos de chonta (*Bactris gasipaes* Kunth), en cinco localidades de la provincia de Orellana (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Carrera Agronomía. Riobamba-Ecuador. 2021. pp. 01-121

SANZ, Susana. *Prácticas de Microbiología* [en línea]. La Rioja-España: La Universidad de La Rioja, 2011. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/DELL/Downloads/Dialnet-PracticasDeMicrobiologia-100835.pdf

SCHRÖDER, Michelle; NAHRUNG, Helen; DE SOUZA, Natalia; LAWSON, Simon; SLIPPERS, Bernard; WINGFIELD, Michael; & HURLEY, Brett. “Distribution of *Gonipterus* Species and Their Egg Parasitoids in Australia: Implications for Biological Control”. *Forest*, vol. 12, n° 8 (2021), (South Africa) pp. 01-16.

SCHRODER, Michelle; SLIPPERS, Bernard; WINGFIELD, Michael; HURLEY, Brett. “Invasion history and management of *Eucalyptus* snout beetles in the *Gonipterus scutellatus* species complex”. *Revista de Ciencia de Pagas* (2019), (South África). pp. 01-33.

SIERRA, Jennifer; ESPINOZA, César; GUZMÁN, Oswaldo; TRIGOS, Ángel; & SALINAS, Alejandro. “Characterization of *Fusarium* species that affect the asparagus crops cultivation in Veracruz, Mexico”. *Scientia Agropecuaria*, vol. 13, n° 4, (2022), (México) pp. 343-349.

SILVA PANDO, Francisco; & FERNÁNDEZ DARRIBA, Andrea. “Nuevas aportaciones al género *Eucalyptus* L'Her. (*Myrtaceae*) en Galicia”. *INIAV* vol. 23, n° ½ (2015), (Portugal) pp. 01-16.

SILVA PANDO, Francisco; & FERNÁNDEZ DARRIBA, Andiea. “The genus *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) in Galicia: Identification keys and descriptions”. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* [en línea], 2016, (España), vol. 23, pp. 23-51. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1130-9717. Disponible en: file:///C:/Users/DELL/Downloads/2962-Texto%20del%20art%C3%ADculo-14874-1-10-20160330%20(1).pdf

SMITH, Hugo; & CAPINERA, John. *Enemigos naturales y control biológico* [blog]. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: file:///C:/Users/DELL/Downloads/Enemigos_naturales_y_control_biologico.pdf

SOLÉ OLLÉ, María. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden *Onygenales* (Trabajo de titulación). (Doctoral) Universitat Rovira i Virgili, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Catalunya-España. 2004. pp. 01-140.

SOSA, Acenet; PASOS, Victoria; & TORRES, Dania. “Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco”. *Centro agrícola*, vol. 32, n° 3 (2005), (Cuba) pp.25-29.

SUBDIRECCIÓN DE PLANIFICACIÓN TERRITORIAL PREFECTURA DE IMBABURA. “Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Imbabura 2019-2023” [en línea], 2023. Disponible en: file:///C:/Users/DELL/Downloads/3_pdot_imbabura_2019-2023.pdf

TAMAY DE DIOS, L.; IBARRA, C.; & VELASQUILLO, C. “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”. *Investigación en Discapacidad*, vol. 2, n° 2 (2013), (México) pp. 70-78.

TÉLLEZ JURADO, Alejandro; CRUZ RAMÍREZ, María; MERCADO FLORES, Yuridia; ASAFF TORRES, Alí; & ARANA CUENCA, Ainhoa. “Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos”. *Revista Mexicana de Microbiología*, vol. 30 (2009), (México) pp. 73-80.

TESFAW, Amare; TEFERI, Ermias; SENBETA, Feyera; & ALEMU, Dawit. “The spatial distribution and expansion of *Eucalyptus* in its hotspots: Implications on agricultural landscapes”. *Heliyon*, vol. 9 (2023), (Ethiopia) pp. 01-12. Disponible en: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2405-8440%2823%2901600-6>

ULLOA, Laura. Efecto biocontrolador de *Pseudomonas fluorescens* sobre dos especies de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* sp. (Trabajo de titulación). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. (Cartago). 2011. pp. 01-66.

VAN DRIESCHE, R.; HODDLE, M.; & CENTER, T. *Control of pests and weeds by natural enemies an introduction to biological control*. Europa: Blackwell, Malden, MA & Oxford, 2009, ISBN (978-1-4051-4571-8), p. 323.

VARGAS FLORES, T.; & KUNO VARGAS, A. “Morfología bacteriana”. *Revista de Actualización Clínica*, vol. 49, n° 2 (2014), (Ecuador) pp. 2594-2598.

VELARDE, Sixto; VALDEZ, Nallely; ZAMORA, Francisco; LÓPEZ, Ramón; MELGOZA, Claudia; GARZÓN, José. “Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de

maíz en Sinaloa, México”. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol. 9, n° 8 (2018), (México) pp. 1675-1689.

VERGARA RUIZ, Rodrigo. *Gonipterus complejo scutellatus: Nueva plaga del eucalipto en Colombia que llegó hace cerca de 20 años* [blog]. Colombia: 2016. [Consulta: 01 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.metroflorcolombia.com/gonipterus-complejo-scutellatus-nueva-plaga-del-eucalipto-en-colombia-llego-en-cerca-de-20-anos/>

VILLACIDE, José; & CORLEY, Juan. “Los insectos parasitoides y su utilización en el control biológico de plagas forestales”. *Manejo Integrado de Plagas Forestales* [en línea], 2011, (Argentina) cuadernillo n°11, pp. 01-14. [Consulta: 01 noviembre 2022]. ISSN 1851-4103. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_cuadernillo_11_-_los_insectos_parasitoides_y_s.pdf

WESSELS, Joseph. “Fungi in Their Own Right”. *Fungal Genetics and Biology*, vol. 27 (1999), (The Netherlands) pp. 134–145.

WITHERS, Toni. “Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects”. *Austral Ecology*, vol. 26 (2001), (New Zealand) pp. 467–476.



ANEXOS

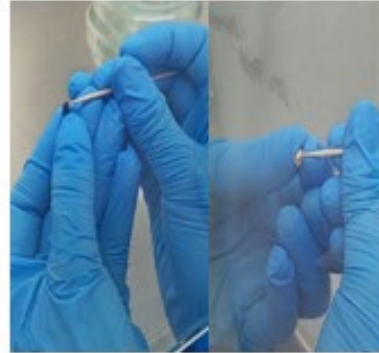
ANEXO A: COLECTAS EN CAMPO



ANEXO B: AISLAMIENTO DIRECTO



Dispensar medio PDA



Obtener el micelio del insecto



Repicar en 4 puntos



Muestras en incubadora a 26°C



Morfotipos por siembra directa



Repicar por separado los 4 puntos

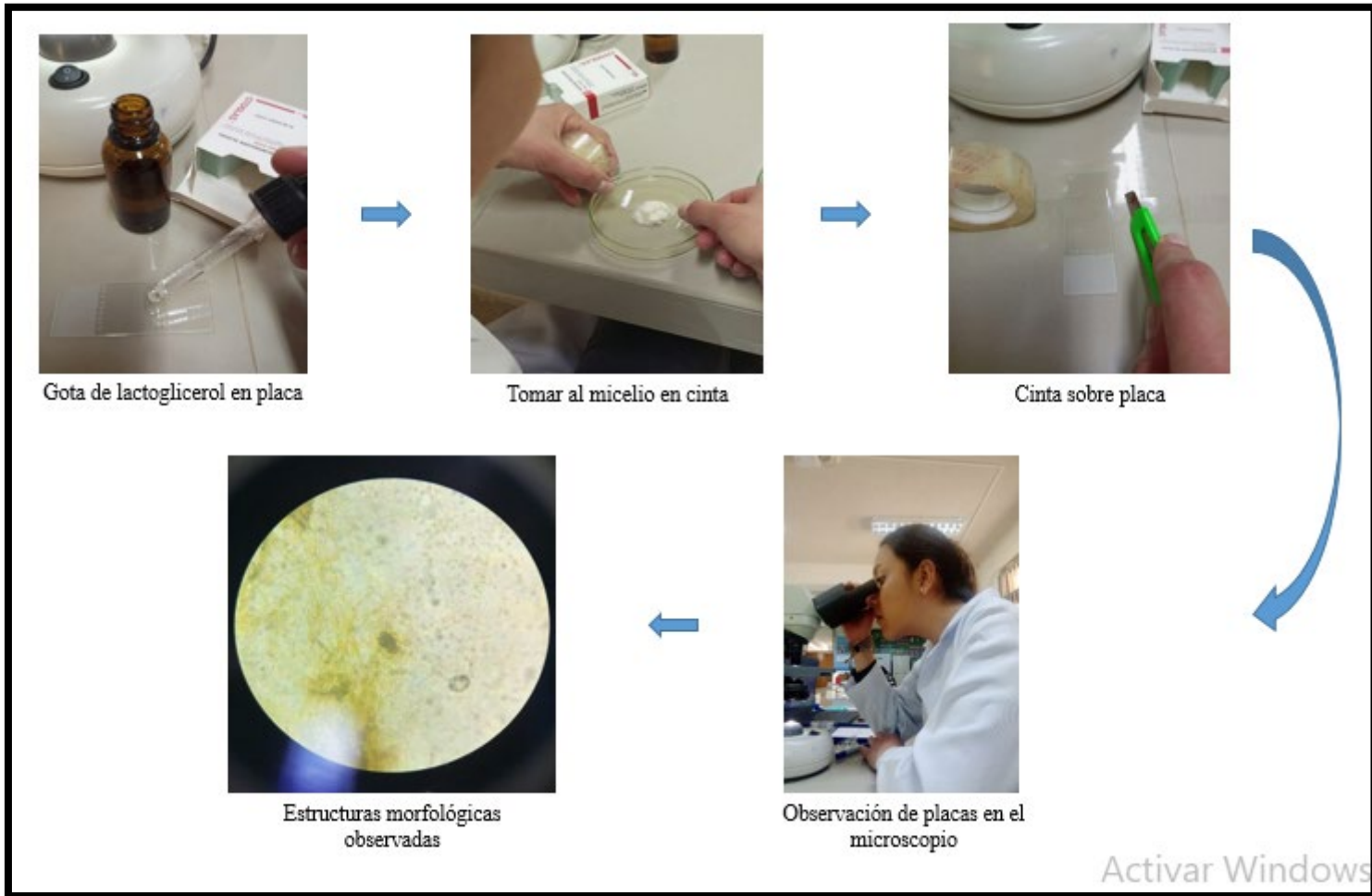


Crecimiento de los 4 repiques

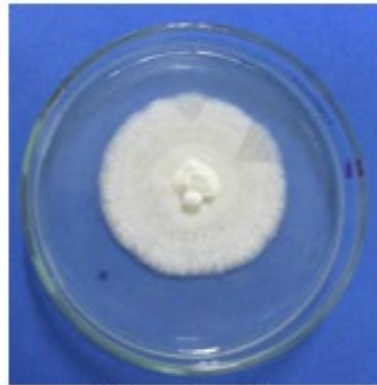
ANEXO C: CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS (MÉTODO CASTELLANI)



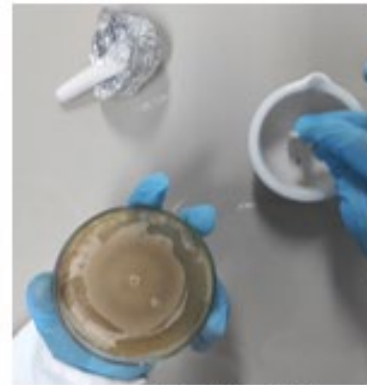
ANEXO D: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA



ANEXO E: LISIS FÍSICA



Aislado cultivado en medio PDA



Extracción del micelio



Nitrógeno



Muestras con micelio



Macerado guardado en microtubos de 2 mL



Macerado del micelio

ANEXO F: LISIS QUÍMICA



Vortex durante 20 segundos



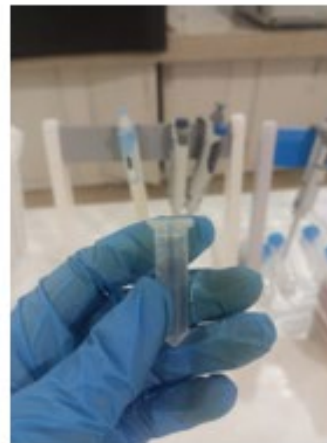
Centrifuga a 14000 rpm



Cloroforma-alcohol isoamilico
con puntas amarillas



Secado del pellet

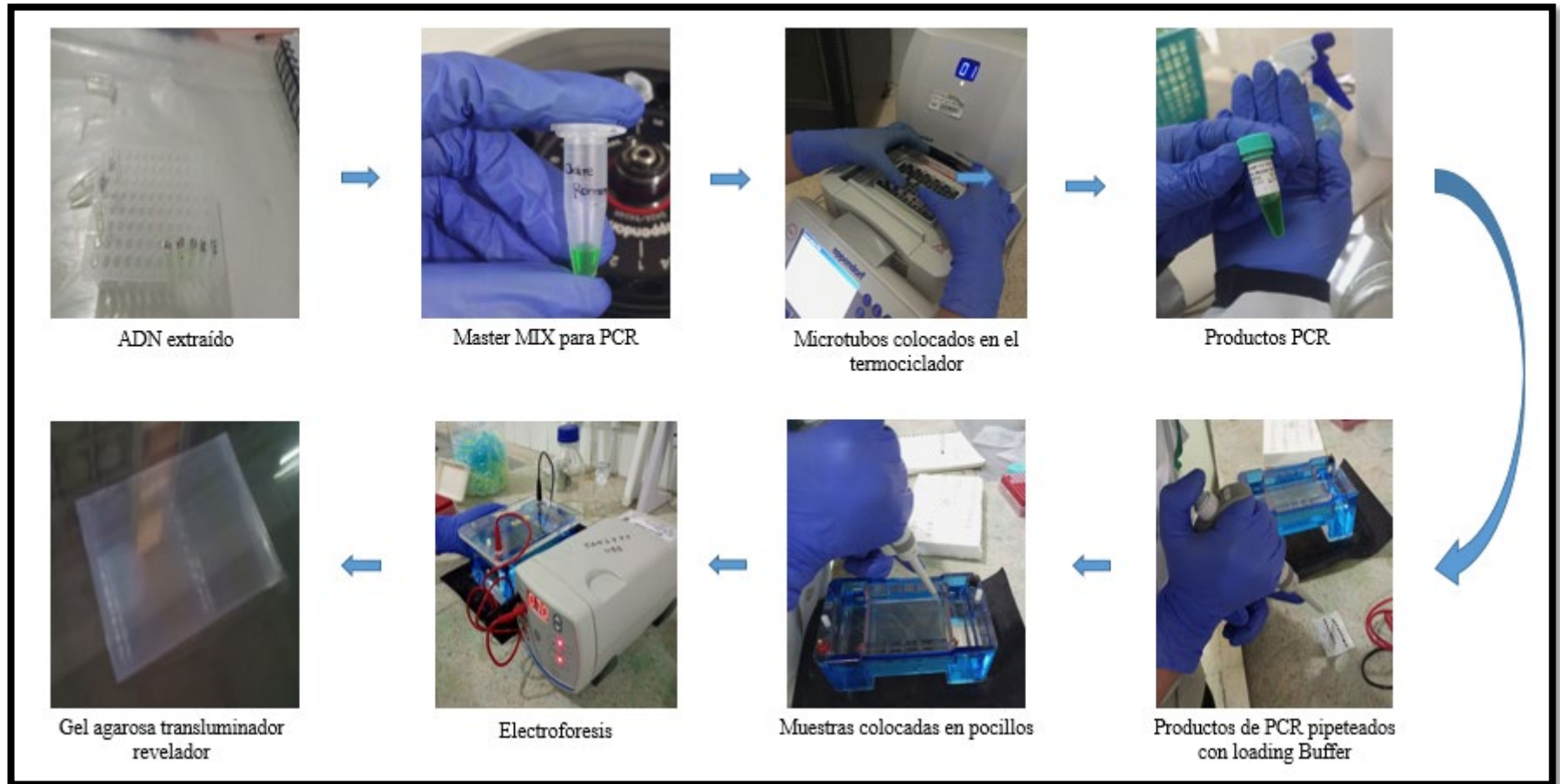


Formación del pellet

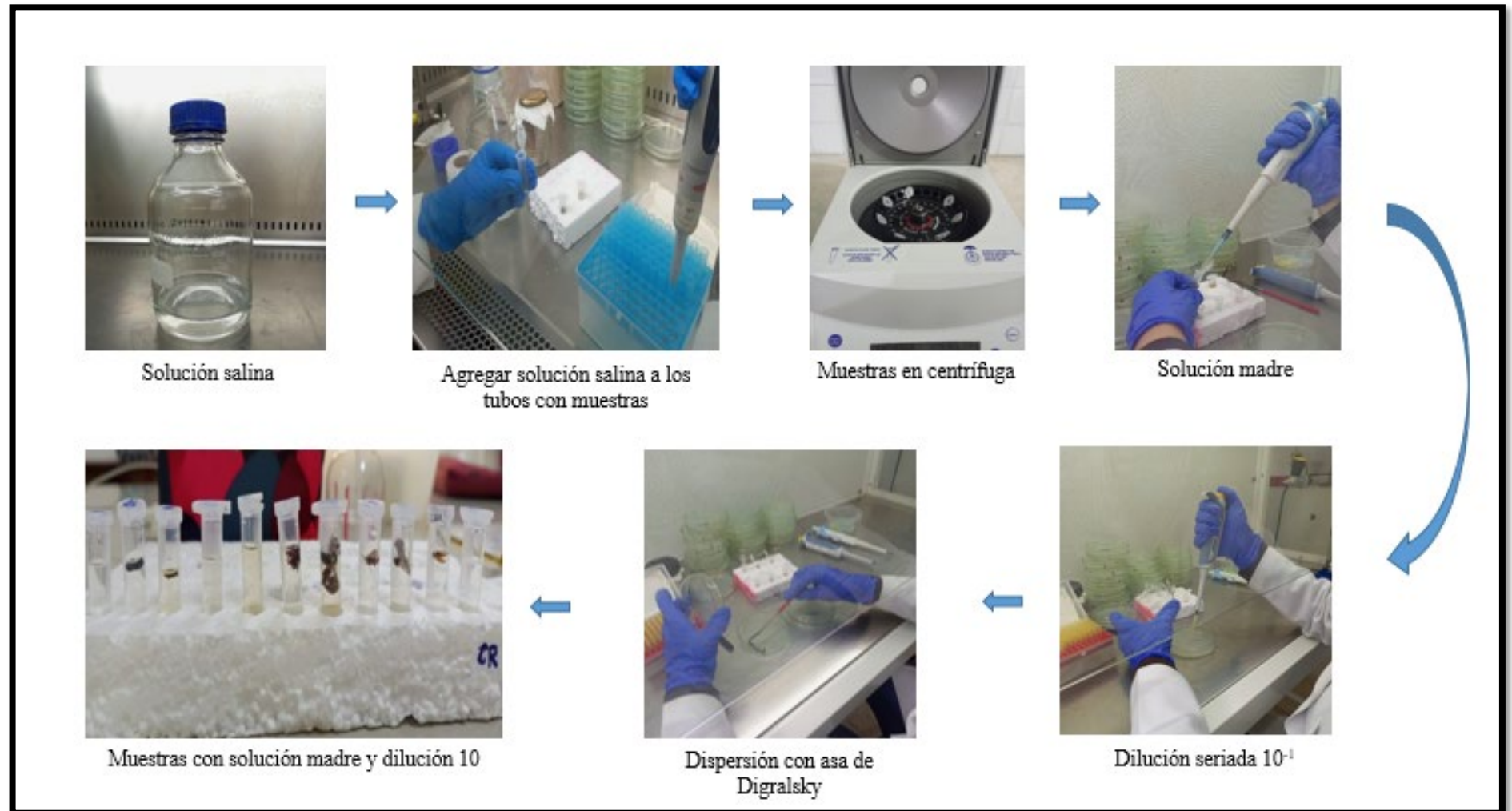


Isopropanol con puntas azules

ANEXO G: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR (PCR Y ELECTROFORESIS)



ANEXO H: AISLAMIENTO POR DLUCIONES SERIADAS



ANEXO I: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA

Pasos: Medio de cultivo PDA
<ul style="list-style-type: none">- Pesar en una balanza de precisión (RADWAG AS220.R2) 40 g del medio PDA.- En una botella de 1 L agregar 1 L de agua destilada estéril y disolver los 40 g del medio PDA pesados.- Esterilizar la mezcla en la autoclave (BIOBASE BKQ-B100II) durante 2 horas a una temperatura de 121 °C y 0,1 Megapascales.- Agregar al medio de cultivo los antibióticos: 10 mL de Chloramphenicol y 10 mL de Streptomicina.
Nota. En 1 L de agua destilada estéril agregar 40 g de PDA.

ANEXO J: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA

Pasos: Preparación de solución salina
<ul style="list-style-type: none">- Pesar en una balanza de precisión (RADWAG AS220.R2) 0,85 g de NaCl.- En una botella de 250 mL o 500 mL agregar 100 mL de agua destilada estéril y disolver los 0,85 g de NaCl pesados.- Esterilizar la mezcla en la autoclave (BIOBASE BKQ-B100II) durante 2 horas a una temperatura de 121 °C y 0,1 Megapascales.- Agregar a la solución salina una cápsula de antibiótico de Chloramphenicol.
Nota. En 100 mL de agua destilada estéril agregar 0,85 g de NaCl.

ANEXO K: PREPARACIÓN DE LACTOGLICEROL

Pasos: Lactoglicerol
<ul style="list-style-type: none">- Medir en una probeta pequeña: 20 mL de ácido láctico, 40 mL de glicerina y 20 mL de agua destilada estéril.- Agrega toda la mezcla en un frasco gotero de ámbar de 100 mL.- Agitar lentamente el frasco, hasta tener una consistencia homogénea.
Nota. En un frasco de 100 mL verter 20 mL de ácido láctico, 40 mL de glicerina y 20 mL de agua destilada estéril

**ANEXO L: RIQUEZA DE ESPECIES, ÍNDICE DE SHANNON E ÍNDICE DE SIMPSON TOTALES DE LOS MORFOTIPOS POR DILUCIONES
SERIANDAS ENTRE LOS RODALES DE LA HACIENDA PISANGACHO**

Rodal	Muestra	Código en R	Diversidad	Observación	Estimador	s.e.	LCL	UCL	Hacienda	Latitud	Longitud	Altitud	Provincia	Medio
R12	50	s1	Species richness	3	3	0	3	3	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	50	s1	Shannon diversity	2,771	2,867	0,206	2,464	3,270	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	50	s1	Simpson diversity	2,618	2,771	0,308	2,168	3,374	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	54	s2	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	54	s2	Shannon diversity	1,966	2,029	0,137	1,761	2,298	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	54	s2	Simpson diversity	1,935	2,060	0,220	1,629	2,492	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R4	72	s4	Species richness	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R4	72	s4	Shannon diversity	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R4	72	s4	Simpson diversity	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R10	84	s5	Species richness	3	3	0,819	3	4,606	H. Pisangacho	0°25'03.60" N	78°13'38.11" O	2486	Imbabura	PDA
R10	84	s5	Shannon diversity	2,585	3,062	0,815	1,465	4,658	H. Pisangacho	0°25'03.60" N	78°13'38.11" O	2486	Imbabura	PDA
R10	84	s5	Simpson diversity	2,270	3,141	1,028	1,127	5,156	H. Pisangacho	0°25'03.60" N	78°13'38.11" O	2486	Imbabura	PDA
R8	85	s6	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	85	s6	Shannon diversity	2	2,101	0,113	1,880	2,322	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	85	s6	Simpson diversity	2	2,231	0,219	1,801	2,661	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	s7	Species richness	3	3,728	1,346	3	6,367	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	s7	Shannon diversity	2,906	4,531	2,265	0,092	8,970	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	s7	Simpson diversity	2,813	0	0	0	0	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	s8	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	s8	Shannon diversity	1,938	1,961	0,058	1,847	2,075	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	s8	Simpson diversity	1,882	1,923	0,104	1,720	2,126	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	s9	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	s9	Shannon diversity	1,645	1,669	0,186	1,304	2,034	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	s9	Simpson diversity	1,466	1,486	0,205	1,083	1,889	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	89	s10	Species richness	3	3	0,92675925	3	4,816	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	89	s10	Shannon diversity	1,794	2,103	0,732	0,667	3,538	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	89	s10	Simpson diversity	1,436	1,516	0,659	0,225	2,808	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA

ANEXO M: RIQUEZA DE ESPECIES, ÍNDICE DE SHANNON E ÍNDICE DE SIMPSON TOTALES DE LOS MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE ENTRE LOS RODALES DE LA HACIENDA PISANGACHO

Rodal	Muestra	Código en R	Diversidad	Observación	Estimador	s.e.	LCL	UCL	Hacienda	Latitud	Longitud	Altitud	Provincia	Medio
R4	72	d4	Species richness	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R4	72	d4	Shannon diversity	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R4	72	d4	Simpson diversity	1	1	0	1	1	H. Pisangacho	0°25'21.67" N	78°12'41.76" O	2383	Imbabura	PDA
R8	85	d6	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	85	d6	Shannon diversity	2	2,101	0,125	1,856	2,346	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	85	d6	Simpson diversity	2	2,231	0,225	1,790	2,672	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	d7	Species richness	3	3,728	1,352	3	6,377	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	d7	Shannon diversity	2,906	4,531	2,231	0,159	8,903	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	86	d7	Simpson diversity	2,813	0	0	0	0	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	d8	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	d8	Shannon diversity	1,938	1,961	0,069	1,825	2,097	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	87	d8	Simpson diversity	1,882	1,923	0,120	1,688	2,158	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	d9	Species richness	2	2	0	2	2	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	d9	Shannon diversity	1,645	1,669	0,163	1,350	1,988	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R8	88	d9	Simpson diversity	1,466	1,486	0,190	1,113	1,858	H. Pisangacho	0°25'07.46" N	78°13'11.16" O	2446	Imbabura	PDA
R12	54	d2	Species richness	2	2	0,1	2	2,196	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	54	d2	Shannon diversity	1,966	2,029	0,140	1,754	2,305	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA
R12	54	d2	Simpson diversity	1,935	2,060	0,205	1,658	2,463	H. Pisangacho	0°25'14.05" N	78°13'55.08" O	2534	Imbabura	PDA

ANEXO N: RESUMEN DE LA RIQUEZA DE ESPECIES ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCIÓN 10⁻¹ EN LOS RODALES DE LA HACIENDA PISANGACHO

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R10	3	0	0	0	0
R12	2,5	0,707	0,5	-3,85	8,85
R4	1	0	0	0	0
R8	2,55	0,79	0,353	1,56	3,53

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R12	2	0	0	0	0
R4	1	0	0	0	0
R8	2,43	0,864	0,432	1,06	3,81

ANEXO Ñ: RESUMEN DEL ÍNDICE DE SHANNON ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCIÓN 10⁻¹ EN LOS RODALES DE LA HACIENDA PISANGACHO

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R10	3,06	0	0	0	0
R12	2,45	0,592	0,419	-2,87	7,77
R4	1	0	0	0	0
R8	2,47	1,16	0,521	1,03	3,92

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R12	2,03	0	0	0	0
R4	1	0	0	0	0
R8	2,57	1,32	0,661	0,461	4,67

ANEXO O: RESUMEN DEL ÍNDICE DE SIMPSON ENTRE MORFOTIPOS DE SOLUCIÓN MADRE Y DILUCIÓN 10^{-1} EN LOS RODALES DE LA HACIENDA PISANGACHO

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R10	3,14	0	0	0	0
R12	2,42	0,503	0,355	-2,1	6,93
R4	1	0	0	0	0
R8	1,43	0,857	0,383	0,367	2,5

Rodal	Promedio	Desviación estandar	Error estandar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
R12	2,06	0	0	0	0
R4	1	0	0	0	0
R8	1,41	0,988	0,494	-0,163	2,98



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

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

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 08 / 08 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: CLAIRE JAZMÍN ROMERO JARAMILLO
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
Carrera: CARRERA INGENIERÍA FORESTAL
Título a optar: INGENIERA FORESTAL
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


D.B.R.A.T.
Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1619-DBRA-UTP-2023