



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional De Biología Con Mención En Biotecnología

Tesis

Para optar el Título de Bióloga con mención en Biotecnología

**Efecto de cepas nativas *Metarhizium spp.* procedentes de cultivo de caña
de azúcar sobre *Metamasius sp.***

Autores

Briguitte Debora, Durand Galarreta

Xiomara Isabel, Zamora Sosa

Asesor

Dr. William Andrés, Guzmán Sánchez

Huacho – Perú

2023

Efecto de cepas nativas *Metarhizium* spp. procedentes de cultivo de caña de azúcar sobre *Metamasius* sp.

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

15%

FUENTES DE INTERNET

9%

PUBLICACIONES

11%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.unjfsc.edu.pe

Fuente de Internet

3%

2

hdl.handle.net

Fuente de Internet

2%

3

www.revistas.unitru.edu.pe

Fuente de Internet

1%

4

repositorio.utn.edu.ec

Fuente de Internet

1%

5

ciencia.lasalle.edu.co

Fuente de Internet

1%

6

repositorio.uea.edu.ec

Fuente de Internet

1%

7

Segundo Benedicto Valle-Ramírez, Roldán Torres-Gutiérrez, Willan Orlando Caicedo-Quinche, Ricardo Vinicio Abril-Saltos et al.

"Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva*

<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO
SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA**



**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGIA**

TESIS

Efecto de cepas nativas *Metarhizium spp.* procedentes de cultivo de caña de
azúcar sobre *Metamasius sp.*

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR :

MSc. Eduardo Sigifredo, Benites Requena

PRESIDENTE

Dr. José Luis , Romero Bozzetta,

SECRETARIO

Ronnel Edgar, Bazán Bautista

VOCAL

Dedicatoria

El siguiente proyecto se lo dedico a:

A Dios por ser siempre guiarnos por el buen camino, a nuestros padres por habernos inculcado buenos valores que el día de hoy nos sirven para lograr desempeñarnos laboralmente.

A nuestras familias que en todo momento nos apoyaron y guiaron, por sus palabras de ánimo, por su amor, que es el aliento de esfuerzo y lucha constante para la ejecución de esta meta.

A nuestros docentes y compañeros que nos inspiran para ser cada día a día mejor.

Agradecimiento

Agradecer de manera especial al Dr. William Guzmán Sánchez por brindarnos las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología, donde se realizamos las actividades de nuestro proyecto de Investigación, por sus orientaciones y ayuda incondicional en la culminación de nuestra Tesis.

A nuestra querida UNJSFC, catedráticos por habernos brindado su valioso conocimiento y sabiduría para nuestra formación profesional.

Índice

Dedicatoria.....	I
Agradecimiento	II
Índice	III
Índice de tablas	VI
Índice de figuras	VII
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
Introducción.....	1
Capítulo I. Planteamiento del problema	2
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	2
1.2 Formulación del problema	3
1.2.1 Problema general.....	3
1.2.2 Problema específicos.....	3
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Justificación de la investigación	4
1.5 Delimitación del estudio	4
Capítulo II. Marco teórico	5
2.1 Antecedentes de la investigación	5
2.1.1 Investigaciones internacionales.....	5
2.1.2 Investigaciones nacionales	6
2.2 Bases teóricas.....	8
2.2.1 Caña de Azúcar: <i>Saccharum officinarum</i>	8

2.2.2 Problemas que afectan a la caña de azúcar	8
2.2.3 Hongos entomopatógenos	9
2.2.3.1 Género <i>Metarhizium spp.</i>	10
2.2.3.2 Clasificación taxonómica	10
2.2.3.3 Rango de hospederos	10
2.2.3.4 Morfología	10
2.2.3.5 Características de <i>Metarhizium spp.</i>	11
2.3. Definición de términos básicos	11
2.4 Hipótesis de investigación	12
2.4.1 Hipótesis general	12
2.4.2 Hipótesis específicas	12
2.4.3 Operacionalización de las variables	12
Capítulo III. Metodología	13
3.1 Diseño metodológico	13
3.1.1 Tipo de investigación	13
3.1.2 Nivel de Investigación.....	13
3.2 Población y muestra	13
3.2.1 Población.....	13
3.2.2 Muestra.....	13
3.3 Técnicas de recolección de datos	13
3.3.1 Recolección de muestras	13
3.3.2 Aislamiento y purificación de cepas nativas de <i>Metarhizium spp.</i>	13
3.3.3 Caracterización fenotípica del hongo	13
3.3.4 Cinética de crecimiento de <i>Metarhizium spp.</i>	14
3.3.5 Recuento de esporas	14

3.3.6 Evaluación de biocontrol sobre <i>Metamasius sp.</i>	14
3.4 Técnicas para el procesamiento de la información	14
Capítulo IV. Resultados.....	15
4.1 Análisis de resultados	15
4.1.1 Recolección de muestras	15
4.1.2 Aislamiento y purificación de cepas nativas de <i>Metarhizium spp.</i>	16
4.1.3 Caracterización fenotípica.....	16
4.1.4 Cinética de crecimiento.....	17
4.1.5 Recuento de esporas	18
4.1.6 Evaluación de biocontrol sobre <i>Metamasius sp.</i>	18
Capítulo V. Discusión.....	20
5.1 Discusión de resultados.....	20
Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones	21
5.1 Conclusiones	21
5.2 Recomendaciones	21
Capítulo VII. Referencias	22
7.1 Fuentes bibliográficas	22
7.2 fuentes electrónicas	27
Anexos.....	28

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los diversos parámetros a estudiar.....	12
Tabla 2. Tratamientos, concentración y muestras aplicadas con el hongo	14
Tabla 3. Datos ambientales y ubicación GPS recepcionados de la zona muestreada en Supe	15
Tabla 4. Tabla de resultados de la aplicación del hongo sobre las larvas de <i>Metamasius sp.</i> a nivel laboratorio	18
Tabla 5. Resultados del ANOVA con un 0,05 de significancia	18

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Área de recolección de muestras en el distrito de Supe (Zona roja)	15
<i>Figura 2.</i> Muestras en medio PDA mostrando los hongos que tienen estructura a <i>Metarhizium spp.</i>	16
<i>Figura 3.</i> Comparación de las características morfológicas del hongo <i>Metarhizium spp.</i> en medio PDA, muestra de esta investigación a la izquierda (A) y muestra de referencia bibliográfica de Bruner et al. (2018) (B).....	16
<i>Figura 4.</i> Identificación taxonómica de <i>Metarhizium spp.</i> muestra de la tesis observados al microscopio 100x (A) y la referencia bibliográfica de Utus (2017) (B).....	17
<i>Figura 5.</i> Curva de crecimiento del hongo <i>Metarhizium spp.</i> realizada cada 24h y medida en cm en placas con medio PDA	17
<i>Figura 6.</i> Esporas en la cámara vistas por microscopia a 40X (flechas rojas).....	18
<i>Figura 7.</i> Larvas de <i>Metamasius sp.</i> usadas en el experimento, viva sin aplicación del hongo a la izquierda (A) y con crecimiento de hongo a la derecha (B)	19
<i>Figura 8.</i> Crecimiento del hongo en las larvas de <i>Metamazius sp.</i>	19

Resumen

Las plagas son un problema muy importante en la agricultura. A pesar de la aplicación de toneladas de plaguicidas, más del 40% de todos los alimentos se desperdicia por el origen de plagas y daños antes de ser cosechados. El control de insecto utiliza un sistema de biocontrol indispensable, ya que estos son inocuos para el agricultor.

Objetivo: Evaluar el efecto de cepas nativas de *Metarhizium spp.* procedentes de cultivo de caña de azúcar sobre *Metamasius sp.*

Metodología: Se realizó una recolección de muestras de diversos terrenos agrícolas de cultivos de caña azucarera en la provincia de Barranca. Se aisló y purificó cepas nativas de *Metarhizium spp.* en PDA a 28°C durante siete días. Para realizar la caracterización fenotípica del hongo se observó la morfología en placa y la estructura microscópica con tinción de azul de lactofenol. La cinética de crecimiento se realizó sembrando las esporas del hongo sobre el extremo de una placa en medio PDA y se calculó el crecimiento luego de 24 horas. El cálculo de la cantidad de esporas/mL se hizo en una cámara de Neubauer con una alícuota de 100 uL. La Evaluación de biocontrol sobre *Metamasius sp.* se realizó con diversas concentraciones de inóculos del hongo, procediendo a darle condiciones de campo a los insectos para aplicar la dosis establecida y se evaluó cada 12 horas la mortalidad de los insectos y el crecimiento del hongo.

Resultados: Se logró aislar el hongo *Metarhizium spp.* de muestras provenientes de suelo de cultivares de caña azucarera procedentes de Supe, se purificó en medio PDA y se logró identificar por morfología en placa y por medio de taxonomía en el microscopio, se realizó una curva de crecimiento para tener la cuantificación del hongo, en la prueba de letalidad se obtuvo un 100% de efectividad del hongo *Metarhizium spp.* sobre las larvas del gorgojo de *Metamasius sp.*

Conclusiones: En este trabajo se aislaron de muestras de tierra hongos entomopatógenos *Metarhizium spp.* para ser utilizados en el control de larvas del gorgojo *Metamasius sp.*, evaluando distintas concentraciones las cuales tienen un 100% de letalidad.

Palabras clave: Cepas nativas, *Metarhizium spp.*, *Metamasius sp.* y biocontrolador.

Abstract

Pests are a very important problem in agriculture. The application of large quantities of pesticides, more than 40% of crops are wasted due to pest origin de pets causing damage before it is harvested. Insect control uses an essential biocontrol system, since these are harmless to the farmer.

Objective: To evaluate the effect of native strains of *Metarhizium spp.* from sugarcane cultivation on *Metamasius spp.*

Methodology: A collection of samples of various agricultural lands of sugar cane crops in the province of Barranca was carried out. Native strains of *Metarhizium spp.* were isolated and purified. in PDA at 28°C for seven days. For phenotypic identification of the fungus, plate morphology and microscopic structure were observed with lactophenol blue staining. Growth kinetics were performed by seeding the spores of the fungus on the end of a plate in PDA medium and growth was calculated after 24 hours. The calculation of the number of spores/mL was made in a Neubauer chamber with an aliquot of 100 uL. The Biocontrol Evaluation on *Metamasius sp.* It was carried out with various concentrations of inoculums of the fungus, proceeding to give field conditions to the insects to apply the established dose and the death of the pests and the growth of the fungus were evaluated every 12 hours.

Results: We were able to isolate the fungus *Metarhizium spp.* from soil samples of sugarcane cultivars from Supe, it was purified in PDA medium and it was possible to identify it by morphology in plate and by means of taxonomy in the microscope, a growth curve was made to have the quantification of the fungus, in In the lethality test, 100% effectiveness of the *Metarhizium spp.* fungus was obtained. on the larvae of the *Metamasius sp.*

Conclusions: In this work, entomopathogenic fungi *Metarhizium spp.* to be used in the control of *Metamasius sp.* weevil larvae, evaluating different concentrations which have a 100% lethality.

Keywords: Native strains, *Metarhizium spp.*, *Metamasius sp.* and Biological Control Agent

Introducción

Desde tiempos antiguos ha habido problemas fuertes con las plagas en las cosechas. A pesar que se aplican toneladas de plaguicidas en distintas partes del planeta, aproximadamente el 40% de la gran cantidad de productos para la alimentación se desperdicia debido a insectos y daños previo a ser cosechados (Paoletti y Pimentel, 2000).

El control a insectos plaga logra usar lógicamente los sistemas de biocontrol aptos, mezclando métodos biológicos, químicos y tradicionales para el monitorio de las plagas. Dentro los métodos químicos se encuentra una alta diversidad de pesticidas (FAO, 2008), los cuales son usados frecuentemente; lo que, luego de aumentar en gran cantidad los valores de productividad, provoca una cantidad de efectos secundarios, uno de ellos es la resistencia de las plagas a los pesticidas (Sánchez *et al.* 2000). Por eso los plaguicidas lograr tener problemas secundarios que dañan a la salud humana ya que lograr provocar un daño rápido en la piel, órganos de mucosas, órganos respiratorios, etc. Los envenenamientos crónicos provocan vómitos, aflicciones en el abdomen, diarrea, malestar, ansiedad y desorientación (Rodríguez *et al.* 2014). Por tal motivo los envenenamientos graves asociadas a daños respiratorios, problemas de retención, afecciones en la piel, melancolía, abortos, deficiencia en la concepción, cáncer y dalos neurológicos como lo es el Parkinson. De acuerdo con la OMS anualmente se ocasionan 5 000 000 de problemas de envenenamiento provocado por plaguicidas en lugares cercanos a los campos de cultivo, y el INS reporto que, en los años 2011 - 2012 ocurrieron 19 000 intoxicaciones producto de la aplicación de plaguicidas (Vargas-Vargas *et al.* 2017).

Dentro del control de insectos plagas el biocontrol tiene gran consideración, la cual es el empleo de depredadores ambientales para conservar los habitantes de otros individuos en cantidades menores de las que habría en sus escasas (Moreno, 2011).

Los hongos del género *Metarhizium* causan enfermedades en insectos, son muy conocidos por su gran poder para controlarlos, llegando a eliminar a aproximadamente 200 de ellas, incluyendo también a diversas clases de plagas (Kepler *et al.* 2015; Keyser *et al.* 2015). La patogenicidad la cual ocasiona es conocida como el deceso verduzco, denominada de esta forma ya que se aprecia la conformación de exosporas verduzcos en el cadáver del insecto.

Este individuo se puede encontrar en una amplia diversidad de ambientes alrededor del globo, llegando a encontrarse en la tierra hasta 106 propágulos en un gramo de suelo (Behie *et al.* 2012).

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción de la realidad problemática

La caña de azúcar es un cultivo con gran valor en venta internacional con un aporte de 1,45 millones de toneladas, convirtiéndose en 10,5 millones de t por año de la caña en una cantidad de 85 000 hectáreas, Perú es la nación que consigue gran productividad en la agricultura mundial por la caña de azúcar, con 121,8 t por ha aproximadamente al año 2018 (MIDAGRI, 2020).

Actualmente existen diversas plagas conllevando de una u otra forma una gran pérdida económica en la agricultura, el gorgojo rayado también conocido como “picudo” o *Metamasius* sp., es muy común en la parte de las zonas cañeras, presentando características temporales, los signos que causa la ingesta del *Metamasius* sp. se ocasionan en la parénquima del tallo, en su estado “pupal”, se da la destrucción del tejido parenquimático, dejando en su reemplazo un bagazo seco y mal oliente fermentado, que posteriormente serán atacado por bacterias y hongos, cuando están en su estadio larvario producen largos agujeros dentro de los tallos de la caña ocasionando que la planta crezca de manera inclinada y descienda en la tierra (Helfgott *et al.* 2016).

Metarhizium sp. es denominado como un hongo filamentoso y empleado para combatir insectos, también el empleo de sus enzimas es usado como catalizador en la industria. Estudiado y utilizado principalmente como intermediario en el biocontrol a cultivos de caña azucarera, palma de oliva y coco siendo aplicados con éxito en los años 1970 en Brasil para controlar a los insectos que dañan la caña azucarera (Alonso-Díaz *et al.* 2007).

La alternativa con alto potencial es el uso de microorganismo, los cuales son bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos los cuales buscan disminuir los daños al medio ambiente, principalmente la atención por seres con capacidad de biocontrol de insectos, primordialmente, por los que puedan ser propagados in vitro y/o a gran nivel, la cual sería una opción muy eficiente frente al proceso de control químico de insectos lo que ayudaría a la disminución de riesgos a la salud humana y disminuiría el daño ambiental, este método ecológico viene siendo cada vez más utilizado como una alternativa enfocada en la agricultura sustentable (Bautista *et al.* 2018).

El proceso de propagación del hongo entomopatógeno es cuando la espora es depositada en la cutícula de la plaga y este procedimiento de adherencia sucede en tres niveles seguidos como: acoplamiento de la espora a la cubierta por medio de la identificación de receptores

característicos de origen glicoproteico en la plaga, la adherencia o estructura de la fase sucesiva de la espora pre desarrollada , la cubierta, por último el desarrollo y crecimiento hasta la conformación del tubo germinativo para empezar el ciclo de la inclusión (Pedrini *et al.* 2007).

Por ello es de suma importancia evaluar el efecto del hongo *Metarhizium spp.* ya que sería una opción eficiente y accesible con el medio ambiente para combatir el insecto *Metamasius sp.*, que mucho daño les hace a los cultivos.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Se puede evaluar el efecto de cepas nativas de *Metarhizium spp* procedentes de cultivo de caña de azúcar sobre *Metamasius sp*?

1.2.2 Problema específicos

- ¿Se podrá aislar las cepas nativas de *Metarhizium spp* procedentes cultivares de caña de azúcar?
- ¿Se logrará identificar fenotípicamente las cepas nativas de *Metarhizium spp* procedentes cultivares de caña de azúcar?
- ¿Se logrará evaluar el porcentaje de antagonismo de *Metarhizium spp* sobre *Metamasius sp.* a nivel laboratorio?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de cepas nativas de *Metarhizium spp.* procedentes de cultivo de caña de azúcar sobre *Metamasius sp.*

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar las cepas nativas de *Metarhizium spp.* procedentes cultivares de caña de azúcar
- Identificar fenotípicamente las cepas nativas de *Metarhizium spp.* procedentes cultivares de caña de azúcar.
- Evaluar el porcentaje de antagonismo de *Metarhizium spp.* sobre *Metamasius sp.* a nivel laboratorio.

1.4 Justificación de la investigación

La obtención de nuevas herramientas biotecnológicas se muestra como una opción para aminorar la gran pérdida de cultivos de caña de azúcar a causa del coleóptero *Metamasius* sp. insecto plaga y a la vez incrementar continuamente la conciencia ecológica, la cual beneficiaría el incremento de planes fundamentados en el empleo de componentes autóctonos procedentes de los procesos de protección que muestran los seres vivos en el medio ambiente.

Actualmente, existen diversas enfermedades relacionadas al empleo excesivo de agroquímicos en los cultivares, que quieren resolver o frenar dificultades provocados por insectos dañinos y/o patologías por lo que se requiere el empleo de controladores biológicos.

De esta manera es necesario obtener cepas nativas del hongo *Metarhizium* spp. procedentes de cultivares de cañas azucareras, contribuyendo a medir los grupos de plagas, las cuales se sujetan mucho de la sensibilidad del cultivo o de la agrupación de la plaga y el hongo para poder utilizarlas como biocontroladores del insecto plaga *Metamasius* sp. en condiciones controladas.

Por lo tanto, el siguiente estudio estudió la eficiencia de los microorganismos autóctonos a partir de *Metarhizium* spp. sobre *Metamasius* sp., debido a la escasa información de trabajos específicos enfocados al uso de hongos entomopatógenos en cultivos de caña azucarera y de esta forma emplear técnicas biotecnológicas. Los resultados permitieron brindar conocimiento a partir de un protocolo que permitan el aislamiento e identificación de *Metarhizium* spp. aislados de las raíces de la caña azucarera y evaluar su patogenicidad a *Metamasius* sp. en condiciones *in vivo*, clave fundamental a la sustitución de agroquímicos sintéticos.

1.5 Delimitación del estudio

El siguiente estudio se ejecutó en el Laboratorio N° 203 (SL01LA10) de la UNJFSC - Huacho. Las muestras de la comunidad microbiana estuvieron asociadas a la rizosfera del cultivares de caña azucarera con las que se trabajó procedentes de la ciudad de Supe de la cual se aisló las cepas nativas de *Metarhizium* spp.

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Investigaciones internacionales

El-Gendy *et al.* (2022), analizaron la patogenicidad fúngica de dos hongos contra las pupas de *B. zonata*. y su patogenicidad sobre las moscas adultas y como resultados obtuvieron que el hongo *M. anisopliae* presenta mayor patogenicidad para las pupas de *B. zonata* en 2,3 y 5 diferentes post-tratamiento que *B. bassiana*. Los efectos fúngicos de patogenicidad de las larvas tratadas se extendieron a los adultos supervivientes. La concentración fúngica y el intervalo de post exposición tuvieron un impacto inverso sobre las pupas, con un 63.8 % y un 63,59% de mortalidad. *Metarhizium anisopliae* a comparación de *B. bassiana* mostró más virulencia; obteniendo un valor más bajo de LT50 fue de 9,48 días por parte de *M. anisopliae* y de 13,33 días por parte de *B. bassiana*, en función de la concentración fúngica probada de $2,3 \times 10^6$ conidios/ml. Los autores llegaron a la conclusión que los hongos entomopatógenos ensayados podrían considerarse agentes de biocontrol prometedores contra *B. zonata* con potencial uso en la supresión de moscas mediante su aplicación al suelo en programas de MIP.

Nisar *et al.* (2021), determinaron un bioensayo para comprobar la patogenicidad de los bioplaguicidas fúngicos y bacterianos contra *B. zonata*. La patogenicidad de todos los bioinsecticidas probados revelaron que la concentración máxima (1×10^8 UFC ml⁻¹) de *M. anisopliae*, causó un, 96 a 100 %, *B. bassiana* 96 a 98 %, *L. lecanii* 33 a 40 % y *B. thuringiensis* 20 a 22,4 % de mortalidad en *B. zonata*, respectivamente, a los 7 días de intervalo post- aplicación (IPA), en comparación con la mortalidad demostrada por la misma concentración a los 5 días de IPA.

Valle *et al.* (2021), caracterizaron 20 cepas nativas del hongo *Metarhizium anisopliae*, seleccionaron las cepas con mayor potencial de control biológico sobre la infección del Salivazo (*Mahanarva andigena*) causantes de quemaduras de las hojas en cultivos de caña de azúcar. Entre los resultados reportaron que la mejor temperatura de propagación está entre 25 a 30 °C, las cepas presentaron un nivel de desarrollo de 2.90 mm diario y una máxima producción de conidios de 1×10^9 a los 20 días de incubación; mostrando una alta tasa de patogenicidad como micoinsecticidas de *Mahanarva andigena*, por lo que los autores recomiendan profundizar con ensayos a condiciones de laboratorio, invernadero y en campos agrícolas.

Abdel-Raheem et al. (2019), evaluaron la virulencia de esporas fúngicas y nanopartículas de plata de hongos entomopatógenos (EPF) sobre *R. ferrugineus* en condiciones de laboratorio, donde se prepararon concentraciones de esporas fúngicas y nanopartículas de plata de los hongos, mostrando una tasa de mortalidad del 70 - 90 % en 7 días en la fase de huevo. El aislado *V. lecanii* se probó en huevos, larvas y adultos. Las esporas de *M. anisopliae* incrementaron el deceso de los huevos y disminuyeron su incubación. La tasa de deceso de los huevos fue un 80% y la tasa de mortalidad de la fase adulta fue del 70 % en 7 días, cuando se trataron con *M. anisopliae* del 60 % con *B. bassiana* y del 53 % con *V. lecanii*, *M. anisopliae* fue más eficaz entre 50 – 100 % sobre *R. ferrugineus* que *B. bassiana*.

Gato et al. (2015), determinaron las características fisiológicas y culturales de siete aislamientos en cuba de *Metarhizium* spp. con poder patogénico sobre *C. formicarius*. Describieron la forma de las cepas y se encontraron diversos tamaños de las exosporas. Se estableció el porcentaje de producción y el número de esporas provocadas en diversos agares de crecimiento. También, calculó el aumento y el resultado de la muestra expuesta a grados de crecimientos de 28, 30, 32, 34 y 37 °C. Los aislamientos mostraron acción fitopatógena hacia *C. formicarius* y se mostró, entre los cimientos de las descripciones resultantes, que forman parte del conjunto de grupos de *M. anisopliae*. Los datos resultantes mostraron que el promedio de grados de crecimiento óptima para desarrollar los aislados es de 28 a 30°C. Las cepas LBM-5 y LBM-10 resultaron con mejor nivel de propagación a los niveles de crecimientos y agares de crecimiento analizados. La gran cantidad de exosporas en las cepas se encontró en agar Sabouraud y Extracto de Malta.

2.1.2 Investigaciones nacionales

Sánchez (2020), evaluó la cantidad de *Syphrea* sp. empleando un análisis de DCA que consiste en cuatro tratamientos y cuatro bloques, en cada experimento se hizo el conteo de *Syphrea* sp. en cinco plantaciones elegidas, el grupo experimental por plantaciones se evaluó en 13 organismos *Syphrea* sp., en análisis de poblaciones previa del experimento, los documentos conformados a \sqrt{x} y por DUNCAN ($p < 0.05$) se encontraron que los grupos son parecidas (T0, T1, T2 y T3), también, se ejecutaron tres aplicaciones del métodos de T1, T2 y T3, luego del empleo”, *B. bassiana* y *M. anisopliae* las aplicaciones no disminuyeron los grupos, los tratamientos aplicados de los hongos no provocó algún daño en los grupos de *Syphrea* sp.; luego de análisis en exteriores, se procedió a una inoculación secundaria de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la cual se colectó 20 plagas de diferente zona del experimento, para confirmar la aparición de los hongos agregados. Concluyo que *B. bassiana* es el

controlador biológico el cual reduce la cantidad de la plaga y su optimización muestra que el T1 de 9 % tiene un 3 % de eficiencia y el T3 tiene un 1 % de daño por *B. bassiana*.

Ríos et al. (2020), estudiaron la afinidad y eficacia de dos hongos para el biocontrol de patógenos dañinos en plantas de col y de lechuga sembrados por el método de acuapónica constituido por recipientes de *Piaractus brachyomus*. Los cuales se prepararon en sustancias de esporas de los hongos. Las evidencias son sometidas a un DCA, y se analizaron mediante Tuckey, de las cuales 5 % mostraron que los hongos ocasionaron el 73 % de decesos de *B. tabaci* en lechuga, el hongo *B. bassiana* provocó el 84 % de decesos para el hongo *B. brassicae* en las hojas de col en más de 20 días. En hojas de col, con los hongos tuvo un 79% de decesos en seis días y *M. anisopliae* un 88% a los 23 días luego de su inoculación. *B. bassiana* con *M. anisopliae* analizados son óptimos para el biocontrol de la mosca en hojas de lechuga. *B. bassiana* pero tuvieron mejores resultados en el biocontrol de pulgones y *M. anisopliae* en hojas de col en la inoculación secundaria.

Utus (2017), instaló un ensayo para monitorear el gorgojo de los andes (*Premnotrypes spp.*) por medio del uso de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Empleó un DCA con cinco dosis y cuatro replicas. Usando como fuente el abono de caballo la cual se propaga *B. bassiana* y el *M. anisopliae* se añadieron guiándose de las dosis: cantidad de *Premnotrypes spp.* cada metro cuadrado de la planta, cantidad de *Premnotrypes spp.* cada plantación previa del principal aporqueo, cantidad de *Premnotrypes spp.* cada plantación previa del segundo aporqueo, cantidad de insectos maduros infectados de *Premnotrypes spp.* cada plantación previa del segundo aporqueo, cantidad de larvas saludables y dañadas por metro cuadrado de campo, para terminar, se analizó la productividad, Salubridad de perjuicio de tubérculo provocados por las larvas del insecto. Los procesos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* resultaron con gran productividad en el T3, T1 y T4 en lasp latanciones y mas bajas en las dosis T2 y T5 se ha adquirido en la plantación de papa huayro. La dosis T4 es considerado el óptimo, al aminorar el problema ocasionado por el insecto a un grado de 3 %, a diferencia del control 25 % de problema provocado por las larvas del insecto. Hay la posibilidad de usar abono de caballo cómo compuesto para propagar los hongos y así agregar en sembríos de papa en zonas de cultivos.

Ccallohuari (2013), evaluó el poder de controlador biológico de cuatro agentes fitopatógenos, en los estados de larva 2 y 3 de *S. finitimus* (mosca del olivo) a nivel laboratorio, por eso se recolectó los insectos en cultivos de olivo, después se dispuso su

crecimiento en un invernadero, a cual a diario se analizó el incremento de la temperatura de 28 °C hasta que se logró obtener los estados de ninfa 2 y 3. Los resultados invitro obtenidos con cantidades de 104 ,106 ,108 conidias/mL a diferente clases del hongo, y sus repeticiones, para diversas concentraciones. Estas concentraciones llegaron a ser aplicadas en hojas de olivo con estados de ninfa 2 y 3 del insecto.

Rojas (2013), estudió 4 tratamientos: un control, con dosis de *B. bassiana*, con dosis de *M. anisopliae* y con dosis de la concentración de los hongos. Utilizó un DCA determinado de las aplicaciones de los hongos y la concentración de los dos hongos, no revelaron un dato importante para el tratamiento de plagas consumidoras de folíolos como las plagas de *Diabrotica*, y de *Manduca*. Asimismo, evaluaron variables como: el tamaño de la planta, medida de la copa, medida del tallo, cantidad de ramificaciones, medida y tamaño del fruto, masa del fruto por plantación y producción por área. Apreciaron que se encuentra desigualdad en los niveles de los datos analizados, en los que el control y la dosis de *M. anisopliae*, presentaron los mayores resultados, luego de la dosis y concentración de los hongos.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Caña de Azúcar: *Saccharum officinarum*

Plantación de ambiente cálido con similitudes con algunas otras poáceas, en su tronquillo se almacena una fuente rica en sacarosa, el cual se extrae para producir azúcares de mesa y derivados como etanol, biocombustibles, abonos orgánicos, alimentos para animales, etc.; estos productos originan una agroindustria que proporciona trabajos, contribuyendo directamente en la economía del país. Los compuestos de azúcares y celulosa los cuales son los primordiales componentes en la planta, estos están constituido de azúcares naturales como lo son la glucosa o la dextrosa y la fructosa o la levulosa, estos se hallan en mínima proporciones que los azúcares. Además, se encuentran diversos componentes que se encuentran aún en más mínimas proporciones como las sales minerales, las proteínas, las ceras, las grasas y los ácidos que podrían encontrarse en estado disperso o mixta (Rodríguez, 2005; Santana, 2010).

2.2.2 Problemas que afectan a la caña de azúcar

Se reportan que dicho cultivos son susceptibles a plagas, enfermedades y ataques ocasionados por fitopatógenos como en el caso del género *Metamasius* siendo dichos coleópteros en la fase adulta que siente atracción por la fermentación de la caña azucarera,

por lo que produce cortes en el tallo que cuando se encuentran en la etapa adulta son atraídos por la fermentación, produciendo cortes en los tallos donde de esta manera colocan sus huevos, llegando así a su estado larvario producen galerías en los tejidos sanos dañando el tallo y ocasionando descomposición y fermentación que deteriora la condición del extracto afectando el tejido vegetal sano. La disminución de la masa y concentración de azúcares son ocasionadas a que los insectos ingieren mucho tejido foliar disminuyendo así la producción de jugo y aumentando la concentración de fibra, estos cultivares son dañados principalmente en su estructura, donde tienen sus nudos transformados en una estructura degradada de bagazo fermentado y putrefacto (Jiménez, 2009).

Los tallos rotos o derrumbados que se elaboran son el resultado de los orificios y tuneles realizados por las larvas principalmente muy cerca del piso. El viento, la biomasa de los tronquillos y en diversas ocasiones la irrigación o las lloviznas promueve la demolición de los tronquillos dañados (Mendoza *et al.* 2013).

2.2.3 Hongos entomopatógenos

Pertenecen a un grupo de microorganismos benéficos que presentan capacidad de biocontrol respecto a plagas y enfermedades presente en los campos agrícolas (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011). Establecido por una porción de aproximadamente 750 géneros, esparcidos en el ecosistema y ocasionando daños fúngicos a grupos de organismos (Pucheta *et al.* 2006). La FAO (2003), denominó los géneros con mayor importancia, de los cuales el hongo entomopatógeno de primera importancia es: *Metarhizium* (López-Llorca y Hans-Börje, 2001).

El desarrollo de controladores biológicos es una alternativa para la agricultura en ascenso que busca mitigar a los patógenos e insectos dañinos por medio del empleo de agentes biocontroladores, sin embargo el uso de los hongos que matan insectos se utiliza para el biocontrol plagas que son capaces de infestar produciendo la eliminación de insectos que propagan enfermedades en cultivares (Téllez-Jurado *et al.* 2009) infectan a los artrópodos mediante el ingreso a la cutícula ejerciendo diversos mecanismos de acción, donde las proteínas como la aminopeptidasas e hidrofobina, van a favorecer el uso de enzimas extracelulares en la cubierta de la plaga, dándoles una gran facultad para inhibir que el hospedero adquiera resistencia (Meyling & Eilenberg, 2007).

2.2.3.1 Género *Metarhizium* spp.

Metarhizium spp., antiguamente denominado *Entomophthora* spp., es un hongo con una gran distribución que se encuentra la tierra. El principal uso de *M. anisopliae* es de un organismo microbiológico controlador de plagas sucedió en el año de 1879, con Elie Metchnikoff el cual crío el escarabajo del trigo. Luego más adelante fue empleado para deshacerse de la plaga de la remolacha del azúcar (Bischoff et al. 2009).

2.2.3.2 Clasificación taxonómica

Según CABI, (2013) es:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Deuteromicotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hyphomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

2.2.3.3 Rango de hospederos

Metarhizium spp. usualmente podría aislarse de tierra de los trópicos y en las zonas frías; ya que estas parasitan una gran cantidad de diversidad de plagas y es un intermediario con gran poder como controlador biológico de plagas en la agricultura. Es considerado que daña regularmente gran número de 300 especies de plagas de distintos órdenes. Este hongo se ha empleado para el control y el cuidado contra daños de diversas especies de la familia de la Acridoidea (Bischoff et al. 2009).

2.2.3.4 Morfología

Las cepas tienen una forma con márgenes miceliales blancos. Los conidióforos tienen forma de "cuadros" que cambian de color con la aparición de esporas. El tono cambia a partir de olivo a amarillento-verduzco o verde oscuro. Las esporas conformadas en hifas largas, casi siempre pocos esporodocios, como cortezas. Contrariamente, sin color o caramelizado. Los conidióforos diversos, principalmente con dos o tres ramas por nódulo, circulares o estacas las cuales se reducen repentinamente a la punta. Conidios en fila conformados en las puntas

de las fialides, angostas, circulares, estrecho y seccionados en diversos lados, cristalinos a oliváceos o verduzcos (Orduño, 2009).

2.2.3.5 Características de *Metarhizium spp.*

El hongo está conformado por organismos sin forma, principalmente tienen un tinte verduzco en el momento que producen esporas en los insectos plagas o en medios de cultivos. Este organismo tiene una estructura enteroblástica fialídica, el organismo es una exospora la cual es una fialide. Los conidióforos son mínimos, las cuales conforman conidiomas y las exosporas son ameroconidios, circulares, cristalinos a verduzcos, en secciones del hongo las cuales se juntan y forman estructuras. Al comienzo la coloración de los conidios es blanquecina, cambiando a amarillenta en el crecimiento precoz del conidio (de cuatro a siete días) y luego verduzca cuando los conidios ya están en proceso de maduración (Bischoff et al. 2009). Principalmente son sacados de tierras o se encuentran infectando un gran número de diversidad de insectos, en zonas calidas y frías. Los organismos de este grupo son empleadas como intermediarios para realizar biocontrol hacia diversas especies de la familia Acridoidea.

2.3. Definición de términos básicos

- **Antagonismo:** relación de individuos o elementos que provocan la ausencia de actividades de alguno de ellos.
- **Blastoporo:** es la abertura que se ocasiona en el arquéteron cuando se desarrolla el embrión de un organismo.
- **Cámara de Neubauer:** es un instrumento empleado en para la realización del conteo de esporas y células de microorganismos.
- **Conidio:** es una spora asexual estática conformada principalmente desde una hifa o una conidiógena o esporógena.
- **Conidióforos:** estructura microscópica utilizada en la reproducción asexual de muchas de las esporas nombradas conidios.
- **Entomopatógeno:** se refiere al organismo que tiene la capacidad de provocar un daño a los insectos plaga, llevándolo a su deceso luego de un tiempo pequeño de crecimiento.
- **Esporas:** organismo microscópico unicelular o pluricelular la cual está conformado con el fin de diseminación y subsistencia por un periodo extenso (dormancia) en situaciones desfavorables, y que principalmente es una célula haploide.

- **Fitopatógeno:** individuo, generalmente microorganismo que provoca un daño a las plantas.
- **Microbioma:** conjunto de organismos microscópicos (principalmente hongos, bacterias y virus) que se encuentran en un ambiente en especial.
- **Rizosfera:** es la fracción del terreno cercana a las raíces de las plantaciones, que alcanzan principalmente entre 1 y 3 mm comenzando en la zona superficial de la raíz hasta la parte interna del terreno.

2.4 Hipótesis de investigación

2.4.1 Hipótesis general

Las cepas nativas de *Metarhizium* spp. provocarán un efecto de biocontrol sobre las *Metamasius* sp. procedentes de cultivares de la caña de azúcar

2.4.2 Hipótesis específicas

- Si se puede aislar las cepas nativas de *Metarhizium* spp. procedentes cultivares de caña de azúcar
- Si se lograra identificar fenotípicamente las cepas nativas de *Metarhizium* spp. procedentes cultivares de caña de azúcar.
- Si se podrá evaluar el porcentaje de antagonismo de *Metarhizium* spp. sobre *Metamasius* sp. a nivel laboratorio.

2.4.3 Operacionalización de las variables

Tabla 1.

Descripción de los diversos parámetros a estudiar

Variables	Definición	Dimensiones	Indicadores
<p>Independiente</p> <p>Cepas de <i>Metarhizium</i> spp.</p>	Es una especie de hongos capaces de generar enfermedad en insectos y matarlos	- Condiciones de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> ● Temperatura ● Medio de cultivo
<p>Dependiente</p> <p><i>Metamasius</i> sp.</p>	Coleoptero, distribuido en Centro y Sudamérica, es una especie que barrena tejidos de conducción en tallos y pecíolos de algunas palmeras y otras especies vegetales	- Daño	<ul style="list-style-type: none"> ● Fisiológico

Capítulo III. Metodología

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

El estudio fue experimental

3.1.2 Nivel de Investigación

El nivel del estudio fue de tipo aplicado

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población se conformó por una cantidad de 40 larvas del gorgojo *Metamasius spp.* que fueron recolectadas plantaciones de caña de azúcar.

3.2.2 Muestra

La muestra se realizó con diez repeticiones de cada dosis aplicada del hongo

3.3 Técnicas de recolección de datos

3.3.1 Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas de diversos terrenos agrícolas de cultivares de caña en la ciudad de Supe (Lima).

En la cual se obtuvo un total de 500 g de muestras de tierra de los suelos asociado a la rizosfera de cultivares de la planta, estos se pusieron en bolsas ziploc, se rotularon con la codificación correspondiente y se almacenaron en un cooler. Posteriormente se llevaron a al Laboratorio (SL01LA10) de la UNJFSC para su procesamiento.

3.3.2 Aislamiento y purificación de cepas nativas de *Metarhizium spp.*

Pesamos 10 g de tierra, se agregaron en un frasco que tenía 90 mL de agua con NaCl al 0.85 %. Se homogenizaron y se realizó las diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} , se sembraron las últimas cinco diluciones desde la dilución 10^{-4} hasta la dilución 10^{-9} en Agar Papa Dextrosa (PDA) con el antibiótico cloranfenicol, se incubaron a 28°C por 7 – 14 días. Se repicaron las colonias que presentan características morfológicas propias del hongo *Metarhizium spp.* en placas con medio PDA.

3.3.3 Caracterización fenotípica del hongo

Para corroborar la purificación de las cepas se realizó una caracterización fenotípica por morfología en placa en medio PDA, la cual se realizó en función al crecimiento radial, forma, color y aspecto de la colonia; también se evaluó la presencia de estructuras microscópicas

como conidios, hifas y esporas, para lo cual se realizó tinción de azul de lactofenol, luego de su crecimiento en medio PDA.

3.3.4 Cinética de crecimiento de *Metarhizium* spp.

Para realizar esta prueba se procedió a sembrar unas esporas del hongo sobre el extremo de una placa Petri en PDA, se marcó con un rotulador cada 24 horas el halo de crecimiento alrededor del disco durante 10 días para realizar así la cinética de crecimiento, por el método establecido por Guigon-Lopez et al. (2010).

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

3.3.5 Recuento de esporas

Se diluyeron las colonias de un determinado tamaño (1 cm²) con cultivos de *Metarhizium* spp. en 10 mL de agua, se homogenizo; posteriormente se sacó una alícuota de 0.1 mL. para realizar la valoración de las esporas/g vistas en una cámara de Neubauer, además se determinó la proporción de exosporas con la metodología establecido por Arévalo et al. (2017).

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

3.3.6 Evaluación de biocontrol sobre *Metamasius* sp.

En esta prueba se realizó diversas concentraciones de inóculos del hongo sobre el insecto *Metamasius* sp (Tabla 2). Se procedió a darle condiciones de campo a los insectos para aplicar la dosis establecida de la cepa de *Metarhizium* spp. y se evaluó cada 12 horas la mortalidad de los insectos y el crecimiento del hongo.

Tabla 2.

Tratamientos, concentración y muestras aplicadas con el hongo

Tratamiento	Concentración	Muestras
T0	Control	10
T1	0.5 x 10 ¹⁰ esporas/mL	10
T2	1 x 10 ¹⁰ esporas/mL	10
T3	2 x 10 ¹⁰ esporas/mL	10
Número total de larvas		40

3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

Los valores recolectados se estudiaron usando Minitab versión 26. Realizando un ANOVA. Para analizar las cantidades se empleó el analisis de Tukey a un grado de 0,05.

Capítulo IV. Resultados

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Recolección de muestras

La recolección de las muestras fue obtenida de las porciones de la tierra del cultivares de la caña de azúcar.

El muestreo de los suelos fue realizado al azar, ya que no era necesario establecer un tipo de recolección de muestras, la información de la ubicación del campo se realizó con ayuda de un GPS (Garmin, USA) y otros parámetros que puede medir el equipo (Tabla 3).



Figura 1. Área de recolección de muestras en el distrito de Supe (Zona roja)

Fuente: Google Maps

Tabla 3.

Datos ambientales y ubicación GPS recepcionados de la zona muestreada en Supe

Código	Ubicación GPS	T° Ambiental	Altitud	Humedad
MS-001	S 10° 48' 52'' W 77° 41' 13.5''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-002	S 10° 48' 61'' W 77° 41' 13.9''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-003	S 10° 48' 50,2'' W 77° 41' 14''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-004	S 10° 48' 50,2'' W 77° 41' 13.9''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-005	S 10° 49' 12'' W 77° 41' 13.9''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-007	S 10° 48' 50,2'' W 77° 41' 13.9''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-008	S 10° 48' 58'' W 77° 41' 14.6''	23°C	45 m.s.n.m.	45%
MS-009	S 10° 48' 50,2'' W 77° 41' 13.9''	23°C	45 m.s.n.m.	45%

MS= Muestra de suelo

4.1.2 Aislamiento y purificación de cepas nativas de *Metarhizium spp.*

De las muestras de tierra que fueron procesadas y sembradas en medio de cultivo PDA para hongos y con su dilución correspondiente, las cepas con características de *Metarhizium spp.* con características de colonias inicialmente blanquecinas, que al momento de la producción de esporas se colorean verdusco, estas se seleccionaron (Figura 2), y fueron purificadas.

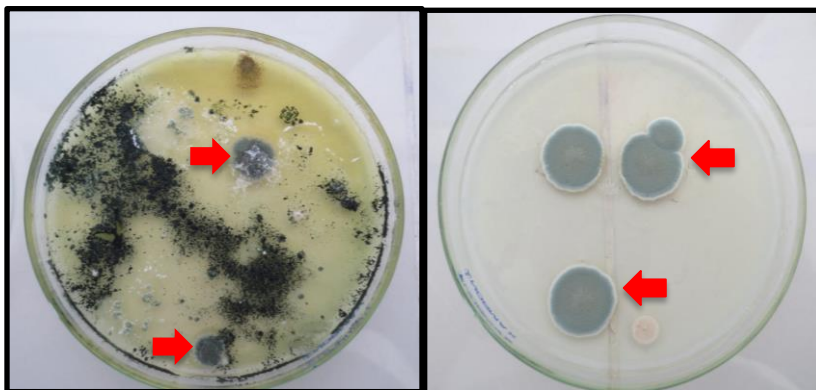


Figura 2. Muestras en medio PDA mostrando los hongos que tienen estructura a *Metarhizium spp.*

4.1.3 Caracterización fenotípica

A las cepas purificadas se le efectuaron observaciones en placa para describir sus características morfológicas por medio de la coloración y estructura del hongo *Metarhizium spp.* de la referencia bibliográfica, donde se aprecia que tienen bordes blancos y las esporas se tornan color verde (Figura 3).

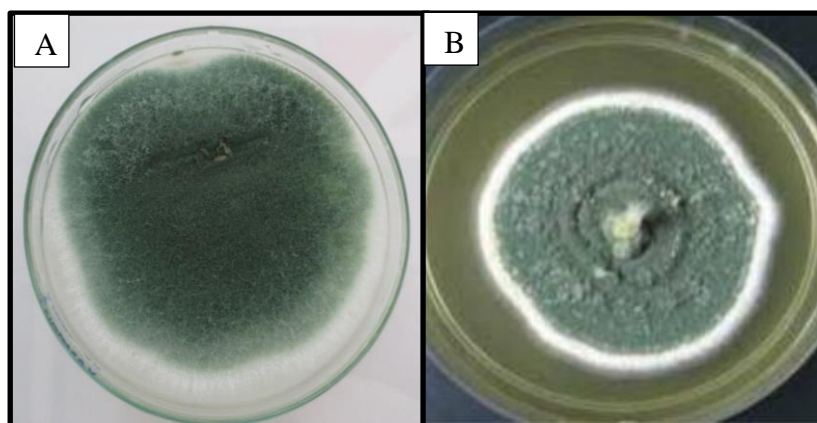


Figura 3. Comparación de las características morfológicas del hongo *Metarhizium spp.* en medio PDA, muestra de esta investigación a la izquierda (A) y muestra de referencia bibliográfica de Bruner et al. (2018) (B)

Las estructuras microscópicas de las cepas puras como: conconiódiforos tienen forma esféricas y ovaladas con aspecto de bastón. Los conidios son largos, ovoides a cilínicos con estructura de cadenas compactadas análogas, que en gran proporción tienen color verdusco oliváceo se colorearon de azul por la tinción de Lactofenol y fueron comparadas con la taxonomía de otra referencia (Figura 4).

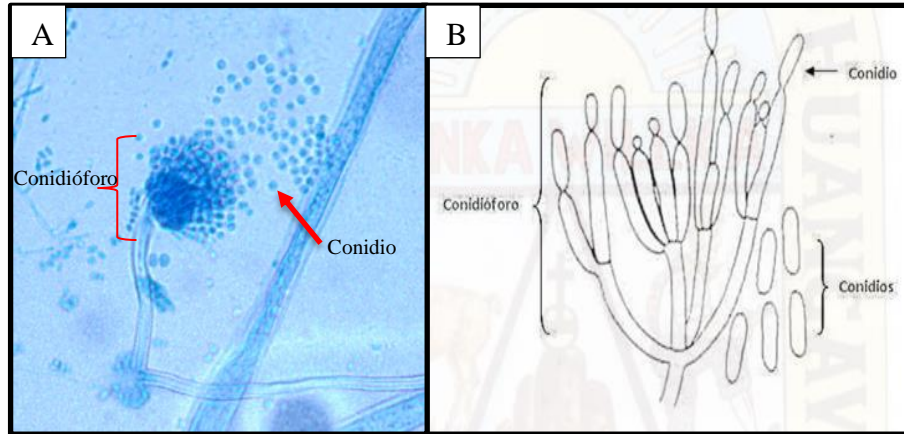


Figura 4. Identificación taxonómica de *Metarhizium spp.* muestra de la tesis observados al microscopio 100x (A) y la referencia bibliográfica de Utus (2017) (B)

4.1.4 Cinética de crecimiento

Se procedió a realizar la curva de crecimiento con los datos obtenidos del crecimiento del hongo en medio PDA con sus respectivas repeticiones y se sacó un promedio y se determinó la zona máxima de crecimiento para luego seguir con el siguiente paso de cuantificación.

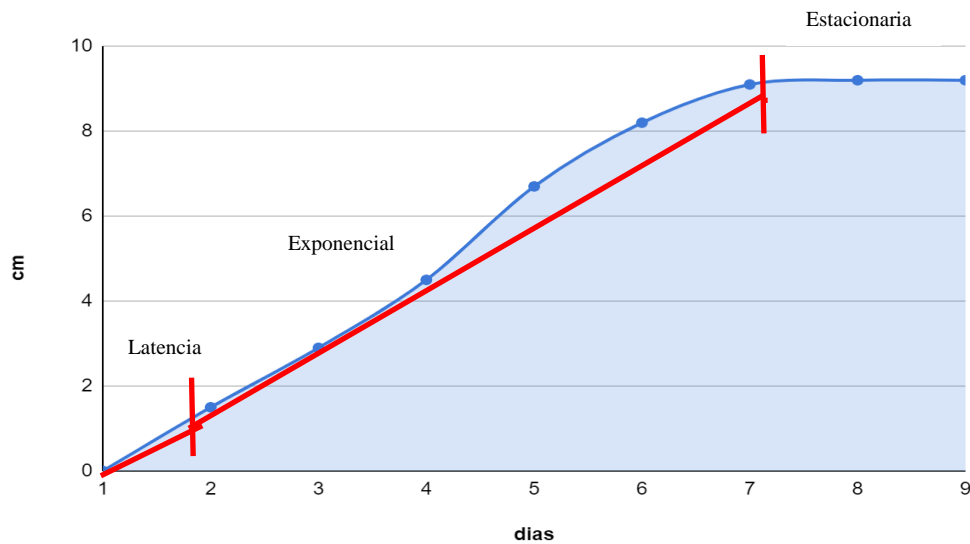


Figura 5. Curva de crecimiento del hongo *Metarhizium spp.* realizada cada 24h y medida en cm en placas con medio PDA

4.1.5 Recuento de esporas

Según la metodología recomendada se efectuó el recuento en la cámara de Neubauer, siguiendo la fórmula establecida para esta metodología.

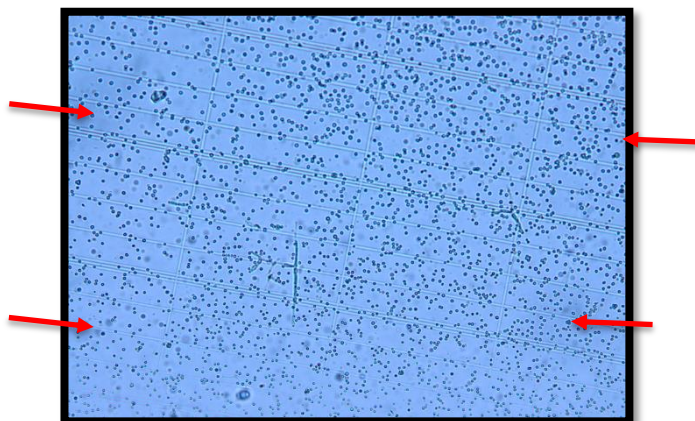


Figura 6. Esporas en la cámara vistas por microscopía a 40X (flechas rojas)

4.1.6 Evaluación de biocontrol sobre *Metamasius sp.*

Para la realización de los ensayos del biocontrol in vitro se usó un tratamiento control con agua y tres diversas concentraciones diversas como se aprecia en la Tabla 2.

Estas concentraciones se aplicaron directamente sobre las larvas de *Metamasius sp.*, se obtuvo un porcentaje de 100% de eficacia sobre el crecimiento del hongo sobre las larvas y su crecimiento total (Tabla 3).

Tabla 4.

Tabla de resultados de la aplicación del hongo sobre las larvas de *Metamasius sp.* a nivel laboratorio

Tratamiento	Concentración	N° de larvas muertas	% de letalidad
T0	Control	0	0
T1	0.5×10^{10} esporas/mL	10	100
T2	1×10^{10} esporas/mL	10	100
T3	2×10^{10} esporas/mL	10	100

Tabla 5.

Resultados del ANOVA con un 0,05 de significancia

FV	SC	GL	CM	F
Entre grupos	75	3	25	65535
Dentro de los grupos	0	0	65535	
Total	75	3		



Figura 7. Larvas de *Metamasius sp.* usadas en el experimento, viva sin aplicación del hongo a la izquierda (A) y con crecimiento de hongo a la derecha (B)



Figura 8. Crecimiento del hongo en las larvas de *Metamasius sp.*

Capítulo V. Discusión

5.1 Discusión de resultados

Aislamos hongos nativos de tierra de plantaciones de caña de azúcar entre ellos el hongo *Metarhizium spp.* de la ciudad de Supe. Torres *et al.* (2013) y Nussenbaum (2014) en sus investigaciones también aislaron cepas nativas de *Metarhizium anisopliados* de muestras que proceden de tierra de cultivares de caña de azúcar, para luego usarla como biocontroladores de insectos plagas.

Las características fisiológicas y morfológicas del hongo *Metarhizium spp.* se logró identificar al compararlo con las características de las referencias bibliográficas, Lopez (2021), el cual identifico cepas de del *Metarhizium*; evaluando su propagacion preliminar micelio de coloración blanca, luego de una productividad de conidios de color verde oscuro, de apariencia arcillosa, revés sin color en placas petri en medio PDA. Además, se corrobora esas pruebas con la imagen en el microscopio de la morfología de los conidios como lo realizo Valle-Ramírez *et al.* (2022).

El efecto de patogenicidad de la cepa del hongo *Metarhizium spp.* sobre las larvas del gorgojo de *Metamasius sp.* fue optima ya que se obtuvo un 100% en todos los tratamientos, al igual que Nuseenbaum (2014) aplico el hongo y obtuvo un 100% de mortalidad sobre insectos plaga del picudo del algodón *Anthonomus grandis*; Mota (2018) obtuvo un 95% sobre larvas de gallina ciega (*Phyllophaga spp*); Alvarez y Gutierrez (2020) consiguieron un porcentaje de mortalidad del 80% para el biocontrol de la plaga de *Tecia solanivora*; los datos obtenido por Gil (2017) con la cepa del hongo la cual tuvo una mortalidad de 58,02% y un Tiempo Letal medio con 18,45 días en el biocontrol de la plaga adulta del gorgojo del banano, a niveles in vitro; Claudio (2020) del entomopatógeno tiene consecuencia importante para la disminución del gorgojo del plátano pero en esta plaga solo tiene un porcentaje de 33,97%, estos resultados demostraron una óptima eficacia sobre los insecticidas químicos.

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se aislaron muestras procedentes de tierra hongos entomopatógenos *Metarhizium spp.* para ser utilizados en el control de larvas del gorgojo *Metamasius sp.* como se aprecia en los resultados estos tuvieron efectos muy óptimos para lograr controlar esta plaga.
- Asimismo, fueron evaluadas distintas concentraciones del hongo aislado, los cuales son importantes para saber cuál es su concentración mínima letal la cual fue 0.5×10^{10} esporas/mL, aunque fue de 100%.
- Según los resultados de las cepas aisladas de *Metarhizium sp.* de tierras de cultivo, son igual de competentes como las comerciales en el control de este insecto plaga.

5.2 Recomendaciones

- Realizar investigaciones con diferentes dosis del hongo *Metarhizium spp.* Para su control sobre *Metamasius sp.* a nivel in vitro en el laboratorio.
- Realizar investigaciones sobre otros estadios del ciclo biológico de *Metamasius sp.* como lo son el estado de pupa y adulto.
- Analizar la cantidad de perjuicio económico que provoca a los agricultores como parte del estudio del insecto y sobre la venta o acceso a este tipo de biocontroladores en el país.
- Proporcionar procedimientos o métodos de crianza del insecto *Metamasius sp.* por medio del uso de alimentación artificial, en condiciones controladas y en el exterior, para tener un acceso más rápido y fácil para futuros estudios.
- Ampliar el estudio en campo, porque las variables son muy distintas en zonas abiertas.

Capítulo VII. Referencias

7.1 Fuentes bibliográficas

- Abdel-Raheem, H.A., ALghamdi, H.A., & Reyad, N.F. (2019). Virulence of fungal spores and silver nano-particles from entomopathogenic fungi on the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera:Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29: 97. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0200-2>
- Alonso-Díaz, M. A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagun. C.A., Rodriguez-Vivas, R.I., & Fragoso-Sanchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 147(3 - 4), 336-340. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.03.030
- Alvarez, C.M. y Gutierrez, D.G. (2020). *Evaluación de la eficiencia de Metarhizium sp y un insecticida comercial sobre la reducción de la población de larvas de Tecia solanivora* (Tesis de pregrado). Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, do. Bomfim y León, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Journal of High Andean Research*. 19(2), 135-144. doi: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2017.272>
- Bautista, E.J, Mesa, L., y Gómez, M.I. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria* 9(4), 585-604. doi: 10.17268/sci.agropecu.2018.04.15
- Behie, S.W., Zelisko, P.M., & Bidochka, M.J. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336(6088), 1576-1577. doi: 10.1126/science.1222289.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. doi: 10.3852/07-202

- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M.R., Moonjely, S., Michael J Bidochka, M.J. and Toriello, C. (2018). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2),1-20. doi: 10.1080/09583157.2018.1531111
- Ccallohuari, E. (2013). *Actividad biocontroladora de Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Verticillium lecanii y Paecilomyces fumosoroseus, sobre los estadios ninfales II y III de Siphoninus finitimus Silvestri (mosca blanca del olivo) in vitro* (tesis de pregrado). Universidad Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.
- Claudio, I.D. (2020). *Efecto de Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae en el control del gorgojo negro del plátano (Cosmopolites sordidus Germar), en las condiciones agroecológicas en el distrito de Monzón-2019* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Hermilio Valdizán Huánuco, Perú.
- El-Gendy, I.R., Zawrah, M., & El-Banobi, M.I. (2022). Virulence effect of *Metarhizium anisopliae* (Met.) and *Beauveria bassiana* (Bals.) fungi against the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(43), 1-7. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00545-3>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O.) (2003). *Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina*. Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO, pp. 33-35.
- Gato, Y., Márquez, M.E., Baro, Y., Porras, A., Ulloa, Y., y Quesada, Y. (2016). Caracterización de aislados cubanos del complejo de especies *Metarhizium anisopliae* con actividad patogénica frente a *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Revista de Protección Vegetal*, 31(1), 50-56.
- Gil, J.C. (2017). *Evaluación de dos cepas de Beauveria bassiana (Báls.) y una cepa de Metarhizium anisopliae (Metsch.) en el control de adultos del gorgojo del banano, Cosmopolites sordidus (Coleoptera, Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Peru.

- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G.D., Bravo-Luna, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S., y Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma spp.* su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2), 87-96.
- Helfgott, S. (2016). *El Cultivo de la Caña de Azúcar en la Costa Peruana*. Lima, Perú: Segunda Edición. Ad Printing S.A.C.
- Jiménez, E. (2009). Métodos de control de plagas. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Kepler, R.M., Ugine, T.A., Maul, J.E., Cavigelli, M.A., y Rehner, S.A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental microbiology*, 17(8), 2791-2804. doi: 10.1111/1462-2920.12778
- Keyser, C.A., Henrik, H., Steinwender, B.M., y Meyling, N.V. (2015). Diversity within the entomopathogenic fungal species *Metarhizium flavoviride* associated with agricultural crops in Denmark. *BMC microbiology*, 15(1), 249. doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0589-z>
- Lopez, E. (2021). *Efecto del hongo entomopatógeno metarhizium spp. en el crecimiento de plantas de maíz (Zea mays L.)* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- López-Llorca, L.V., y Hans-Börje, J. (2001). Biodiversidad del suelo: Control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad*, 3(6), 12 – 15. doi: 10.14198/cdbio.2001.06.02
- Mendoza, J., Gómez, P., y Gualle, D. (2013). Posibilidades del uso *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control del Picudo Rayado, *Metamasius hemipterus*, en caña de azúcar. *CINCAE*.
- Meyling, N.V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145-155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>

- Moreno, R. (2011). *Control Biológico de moscas blancas en cultivos de tomate: interacciones entre sus enemigos naturales* (Tesis de doctorado). Universidad de Barcelona, España.
- Motta-Delgado, P.A., y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90. doi: 10.4136/1980-993X
- Mota, J.A. (2018). *Control de Metarhizium anisopliae sobre Phyllophaga spp bajo condiciones controladas; Jutiapa* (Tesis de pregrado). Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- Nisar, M.J., Gogi, M.D., Atta, B., Tufail, M., Ali, R.A., Naveed, W.A., & Iqbal, M. (2021). Pathogenicity of fungal and bacterial bioinsecticides against adult peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) admixed with adult diet under controlled conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 146. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00481-8>
- Nussenbaum, A.L. (2014). *Aislamientos de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae virulentos para el control del picudo del algodón, Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae)* (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Orduño, N. (2009). *Virulencia de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae sobre el picudo del nopal Metamasius spinolae* (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Paoletti, M.G. & Pimentel, D. (2000). Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 12(3), 279–303. doi: 10.1023/A:1009571131089
- Pedrini, N., Crespo, R. & Juárez, M.P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 146(1-2), 124–137. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.08.003

- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., y De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31(12), 856-860.
- Ríos, R., Vargas-Flores, J., Sanchez-Choy, J., Oliva-Paredes, R., Alarcon-Castillo, T., y Villegas, P.P. (2020). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 419 – 426. doi: 10.17268/sci.agropecu.2020.03.14
- Rojas, J.E. (2013). *Aplicación de hongos entomopatógenos (Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae) en el control de insectos comedores de hoja en el cultivo de ají charapita (Capsicum chinense) en Aguaytía* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa, Perú.
- Rodríguez, L.F. (2005). *Establecimiento de un procedimiento para la conservación de jugo de caña de azúcar variedad POJ* (tesis de pregrado). Universidad de la Sabana, Cundinamarca, Colombia.
- Rodríguez, P., Suárez, T., y Palacio, E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Sánchez, G., Londoño, L., y Peña. (2000). Manejo Integrado de Plagas. En: Manejo Integrado del Cultivo de la papa. Manual técnico. CORPOICA, Bogotá. 160 p.
- Sánchez, A.B. (2020). *Efecto de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae en insecto fitófago Syphrea sp. en Plukenetia volubilis L. bajo condiciones agroecológicas, provincia de Lamas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Téllez-Jurado, A., Cruz, M.G., Mercado, Y., Asaff, A. y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología* 30, 73-80.
- Torres, M., Cortez, H., Ortiz, C.F., Cappello, S., y De la Cruz, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39(1), 40 – 46.

- Utus, E.A. (2017). *Empleo de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae en el control de Premnotrypes spp. en siembras de papa variedad Huayro (Solanum x chaucha) en San Juan de Ampurhuay-Acoria-Huancavelica* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica, Acobamba, Perú.
- Valle, S., Carrera, K., Alemán, R., y Caicedo, W. (2021). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium* spp. para el control de *Mahanarva andigena* en el cultivar de caña de azúcar POJ93 en la Amazonia ecuatoriana. *Idesia*, 39(1), 69-75. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292021000100069>
- Valle-Ramírez, S.B., Torres-Gutierrez, R., Caicedo-Quineche, W.O., Abril-Santos, R.V., Sucoshañay-Villalba, D.J. (2022). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Sanidad vegetal y protección de cultivos* 23(1). doi: https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:2361
- Vargas-Vargas, J.E., Jiménez-Cañizales, C.E., Ivan Andrés Trujillo-Abella, I.A., Ordoñez-Chavarro, R., Zamora-Suarez, A. (2017). Intoxicaciones agudas por sustancias químicas en Ibagué, Colombia en el año 2014; determinación de factores de riesgo para el evento de hospitalización. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 22(2), 1-24. doi: <https://doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019006>
- Santana, T. (2010) *Innovación y Competitividad en la Industria Azucarera de México* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.

7.2 fuentes electrónicas

- CABI (2013). Crop Protection Compendium, Recuperado de: <http://www.cabi.org/cpc>. 2013
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2008). FAO. Gestión de las plagas y enfermedades de la papa. En: <http://www.potato2008.org>.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) (2020). Dirección general de políticas agrarias. *Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego*. Recuperado de: <https://www.midagri.gob.pe/portal/component/content/>

Anexos



Figura 1. Recolección de tierra de las plantas de caña azucarera de la zona de Supe



Figura 2. Bolsas con tierra recolectadas del campo de caña de azúcar procedentes de Supe



Figura 3. Preparación de medios para aislar los hongos.



Figura 4. Proceso de siembra por diluciones seriadas de las muestras de suelo

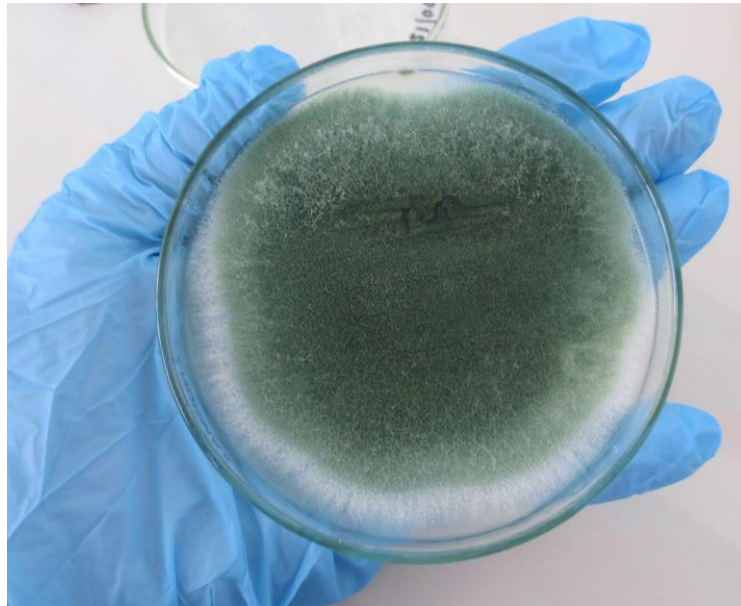


Figura 4. Hongo purificado de *Metarhizium spp.* en placa con medio PDA

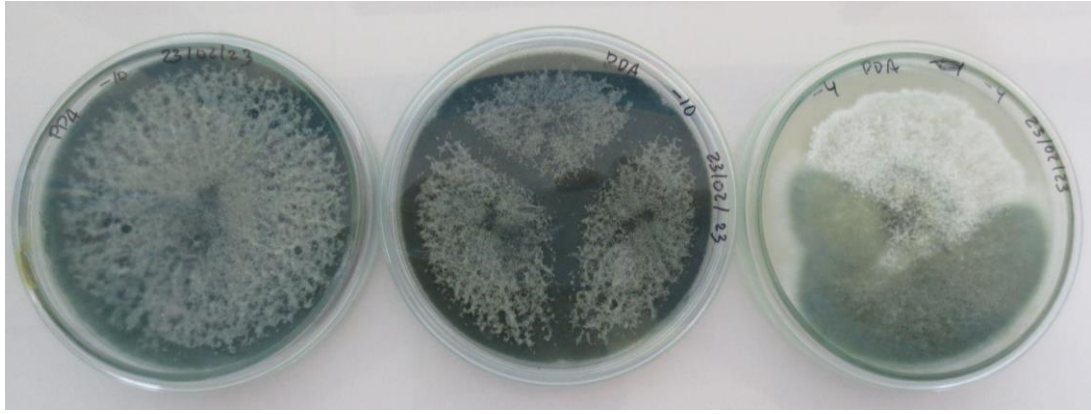


Figura 5. Placas con hongos en proceso de purificación de las muestras de suelos de campos azucareros

Tabla 1.

Datos recolectados del crecimiento del hongo en placas petri para la realización de la cinética

día	N01	N02	N03	N04	promedio
01	0	0	0	0	0 cm
02	1	1.6	1.7	1.6	1.475 cm
03	2.9	2.7	3	3	2.9 cm
04	4.9	3.5	4.7	5	4.525 cm
05	6.9	6.4	6.8	7	6.775 cm
06	7.7	8.7	-	-	8.2 cm
07	9.1	-	-	-	9.1 cm
08	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2 cm
09	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2 cm



Figura 6. Matrices con las diversas concentraciones y tratamientos para la aplicación del hongo a las larvas de *Metamasius sp.*