



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE
LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Metharizium
anisopliae*, PARA EL CONTROL DE PUPAS DE
Anastrepha fraterculus (WIED.) EN GUAYLLABAMBA,
ECUADOR”**

AUTOR: ALARCÓN CASTELLANOS, DANIELA MICHELLE

DIRECTOR: ING. TIGRERO SALAS, JUAN OSWALDO

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "*EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE Metharizium anisopliae, PARA EL CONTROL DE PUPAS DE Anastrepha fraterculus (WIED.) EN GUAYLLABAMBA, ECUADOR*" realizado por la señorita **DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 22 de marzo del 2017

JUAN OSWALDO TIGRERO SALAS

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS**, con cédula de identidad N° 172144665-4, declaro que este trabajo de titulación "**EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE Metharizium anisopliae, PARA EL CONTROL DE PUPAS DE Anastrepha fraterculus (WIED.) EN GUAYLLABAMBA, ECUADOR**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 22 de marzo del 2017

DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS

C.C 172144665-4



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE *Metharizium anisopliae*, PARA EL CONTROL DE PUPAS DE *Anastrepha fraterculus* (WIED.) EN GUAYLLABAMBA, ECUADOR” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 22 de marzo del 2017

.....
DANIELA MICHELLE ALARCÓN CASTELLANOS

C.C 172144665-4

DEDICATORIA

A Dios, la Virgen María y Jesús, en quienes siempre encontré paz, tranquilidad y fortaleza, en momentos con altos y bajos durante toda mi vida estudiantil.

A mis papás Marco y Rita, por ser primero mis amigos incondicionales, los únicos; con su apoyo, consejos, amor y ejemplo, he logrado culminar esta etapa importante; gracias en especial porque en duros momentos, me dieron ánimos y me sacaron una sonrisa donde no existía.

A mi ñaña Andrea por ser mi amiga y cómplice y a mi sobrino Joaquín Emilio, sin tu llegada a mi vida nada hubiera sido igual, gracias por alegrar mis días, espero ser un buen ejemplo para ti siempre.

A Mami Rosa y Papi Fausto, mis abuelitos, su partida de este mundo fue y sigue siendo dolorosa, los recuerdo con mucho cariño, sé que desde el cielo comparten mi alegría y guían mis pasos.

Daniela Michelle Alarcón Castellanos

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la vida, y las bendiciones recibidas para mi familia y para mí a lo largo de esta etapa.

A mis padres, Marco y Rita, mi ñaña Andrea y mi sobrino Joaquín, mi apoyo fundamental en todo momento, gracias por permitirme conocer el verdadero significado de lo que es familia: amor y unidad.

A mis abuelos, tíos y primos, quienes con su granito de arena, siempre me han apoyado desde pequeña.

Al IASA y sus docentes, por orientarme y compartir sus conocimientos, una hermosa facultad sin duda.

Al Ing. Juan Tigreiro, por ser mi guía en la realización de este trabajo, gracias por sus conocimientos, paciencia, dedicación, tiempo y amistad.

Al Ing. Pablo Landázuri e Ing. David Hidalgo, por aportar con sus valiosos conocimientos en la realización de este trabajo.

Al Ing. Raúl Morales, dueño del vivero donde se realizó este trabajo, gracias por su apoyo.

A mis amigos y amigas, en especial a Malena (Taza), Ruthi, Maggy, Cris, Majo, Kathy y Anita quienes me mostraron su amistad desinteresada en todo momento y me brindaron su apoyo, las quiero mucho.

A Wlady, por su cariño, apoyo y ocurrencias, por siempre sacar el lado bueno y divertido de las cosas.

Y a todas las personas que de una u otra manera aportaron en la realización de este trabajo..muchas gracias!

Daniela Michelle Alarcón Castellanos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	2
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 General.....	3
1.3.2 Específicos.....	3

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO	5
2.1 Generalidades sobre la mosca de la fruta.....	5
2.1.1 Taxonomía.....	5
2.1.2 Ciclo biológico de la mosca de la fruta.....	5
2.2 Generalidades del cultivo de Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>).....	8
2.2.1 Ataque de mosca de la fruta en cultivo de Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>).....	9
2.3 Control biológico.....	10
2.3.1 Tipos de control biológico.....	10

2.3.2	Uso de entomopatógenos en el control biológico	10
2.3.3	Medios para el aislamiento de hongos entomopatógenos	11
2.3.3.1	Sabouraud.....	11
2.3.3.2	Dodine	11
2.3.3.3	Papa Dextrosa Agar (PDA).....	11
2.4	Generalidades de <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
2.4.1	Efectividad de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
2.4.2	Características	13
2.4.3	Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
2.4.4	Toxinas.....	15
2.4.5	Profundidad de ataque de <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
2.4.6	Concentraciones para aplicación de <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
2.5	<i>Fusarium</i> sp.....	15
2.6	<i>Aspergillus</i> sp.....	16
2.7	<i>Beauveria</i> sp.....	16
2.8	<i>Rhizoctonia</i> sp.	16

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS	17	
3.1	Lugar de la investigación	17
3.1.1	Ubicación Política	17
3.1.2	Ubicación Geográfica	17
3.1.3	Ubicación Ecológica	19
3.2	Materiales.....	19
3.2.1	Material experimental	19
3.2.2	Material complementario	20
3.3	Métodos.....	20
3.3.1	Diseño experimental.....	20

3.3.1.1	Factores a probar	20
3.3.1.2	Tratamientos.....	20
3.3.1.3	Tipo de diseño	21
3.3.1.4	Diseño en campo	21
3.3.1.5	Características de la unidad experimental.....	21
3.3.2	Métodos específicos de manejo del experimento.....	21
3.3.3	Análisis estadístico.....	27
3.3.3.1	Esquema del análisis de covarianza	27
3.3.3.2	Variables evaluadas.....	27
3.3.3.3	Tipo de análisis estadístico.....	27
CAPÍTULO IV		
RESULTADOS		28
4.1	Determinación de la densidad poblacional inicial de pupas de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wied.), en el suelo superficial (entre 0-10 cm de profundidad) de un cultivo de Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>)	28
4.2	Evaluación de la eficacia de control de tres concentraciones de <i>Metharizium anisopliae</i> en pupas de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wied.)	28
4.3	Evaluación cualitativa de los dos tipos de medio de cultivo PDA y Sabouraud en el aislamiento de <i>Metharizium anisopliae</i>	37
CAPÍTULO V		
DISCUSIÓN		39
CAPÍTULO VI		
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		41
6.1	Conclusiones	41
6.2	Recomendaciones.....	41
6.3	Bibliografía	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Análisis de covarianza	27
Tabla 2	Población inicial de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wied.), en los diferentes tratamientos, en el suelo superficial (entre 0-10 cm de profundidad).....	28
Tabla 3	ANCOVA para el número de pupas infectadas finales bajo el efecto de tres concentraciones de <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
Tabla 4	ANCOVA para el número de pupas eclosionadas iniciales bajo el efecto de tres concentraciones de <i>Metarhizium anisopliae</i>	35
Tabla 5	ANCOVA para el número de pupas vivas finales bajo el efecto de tres concentraciones de <i>Metarhizium anisopliae</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de la mosca	6
Figura 2	Oviposición de las moscas de la fruta.....	6
Figura 3	Larvas de la mosca de la fruta	7
Figura 4	Pupas de moscas de la fruta del género <i>Anastrepha</i>	7
Figura 5	Adulto emergiendo de la pupa, nótese el ptilinum aún presente	7
Figura 6	Adulto hembra de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wied.)	8
Figura 7	Feijoa (<i>Acca sellowiana</i>)	9
Figura 8	Larva de <i>Anastrepha fraterculus</i> en fruto de Feijoa.....	9
Figura 9	Cadáver de chinche del tallo del arroz, <i>Tibraca limbativentris</i> , muerto por <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
Figura 10	Aspecto macroscópico de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
Figura 11	Aspecto microscópico de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
Figura 12	Mapa de la parroquia de	18
Figura 13	Mapa IASA 1	18
Figura 14	Resultados en el tratamiento 1: 1×10^6	30
Figura 15	Resultados en el tratamiento 2: 1×10^7	31
Figura 16	Resultados en el tratamiento 3: 1×10^8	33
Figura 17	Resultados en el testigo	34
Figura 18	Número de pupas infectadas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días	35
Figura 19	Número de pupas eclosionadas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días	36
Figura 20	Número de pupas sanas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días	37
Figura 21	Crecimiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> en los dos medios de cultivo PDA y Sabouraud a los 5, 10 y 15 días del aislamiento en caja Petri.....	38

RESUMEN

Anastrepha fraterculus, plaga principal de los frutales en América Latina, ocasiona graves pérdidas económicas. Para combatirla se aplican controles químicos, físicos, biológicos, entre otros. En ésta investigación se estudió la eficacia de una cepa de *Metarhizium anisopliae*, para el control de pupas de *Anastrepha fraterculus* en un cultivo de Feijoa en Guayllabamba, Ecuador; para lo cual, se evaluaron cualitativamente en laboratorio los medios de cultivo PDA y Sabouraud, para el aislamiento de *M. anisopliae.*, con tres evaluaciones cada 5 días; Sabouraud fue el medio que presentó mayor crecimiento del hongo. Se evaluó la densidad poblacional de pupas en una capa de suelo (0-10 cm de profundidad), la cual no resultó representativa, la localización de las pupas bajo la superficie del suelo, dificultó analizar efectivamente la población. Se evaluaron en campo tres concentraciones de *M. anisopliae.* (1×10^6 UFC, 1×10^7 UFC y 1×10^8 UFC, más un testigo), se realizó una evaluación al aplicar el hongo en el suelo y, en laboratorio, con las muestras de suelo extraídas a los 13, 18, 23 y 28 días de la aplicación, el primer tratamiento (1×10^6 UFC) obtuvo un 20% de eficacia, respecto a los demás tratamientos en los cuales se presentó el crecimiento de: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Beauveria* sp., el bajo porcentaje de eficacia probablemente se debió a que la cepa fue obtenida en una zona con condiciones climáticas diferentes al sitio del ensayo, influyendo en los resultados. Para los análisis estadísticos, se aplicó un análisis de covarianza.

PALABRAS CLAVES:

- *Anastrepha fraterculus*
- *Metarhizium anisopliae*
- MOSCA DE LA FRUTA
- CONTROL

ABSTRACT

Anastrepha fraterculus, is one of the main plagues of the fruit trees in Latin America, that causes serious economic losses. To combat it, there are chemical, physical and biological control measures, among others. In this research the efficacy of a strain of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Anastrepha fraterculus* pupae was studied in a Feijoa crop in Guayllabamba, Ecuador. The PDA and Sabouraud culture media, for the isolation of *M. anisopliae*, were evaluated qualitatively in the laboratory, with three evaluations every 5 days; Sabouraud was the medium with the highest growth of the fungus. The population density of pupae was evaluated in a soil layer (0-10 cm depth), which was not representative, the location of the pupae under the soil surface, made it difficult to analyze the population. Three concentrations of *M. anisopliae* were evaluated in the field. (1×10^6 CFU, 1×10^7 CFU and 1×10^8 CFU plus one control), evaluations were carried out when the fungus was applied to the soil and, in the laboratory, soil samples were taken at 13, 18, 23 and 28 days after application, The first treatment (1×10^6 CFU) was 20% efficient, compared to the other treatments in which the growth of: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp., and *Beauveria* sp., The low percentage of efficacy was probably due to the fact that the strain was obtained in an area with different climatic conditions at the test site, influencing the results. For the statistical analyzes, a covariance analysis was applied.

KEY WORDS:

- *Anastrepha fraterculus*
- *Metarhizium anisopliae*
- FRUIT FLY
- CONTROL

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La mosca de la fruta es una plaga muy importante para muchos países, debido a su capacidad para causar daño en frutales y limitar el acceso hacia los mercados internacionales de productos que pueden hospedar esta plaga. Según las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF) N° 26 (2006), la alta probabilidad de introducción de moscas de la fruta relacionadas con una variedad de hospedantes da como resultado restricciones impuestas por parte de los países importadores para aceptar frutas que procedan de áreas en donde estas plagas están presentes de manera endémica o que se han establecido.

Las especies de la familia Tephritidae, conocidas con el nombre común de “verdaderas moscas de la fruta”, porque en sus estados inmaduros se alimentan en el interior de los frutos de un gran número de plantas cultivadas y silvestres, por lo que diversas especies ocasionan grandes pérdidas económicas para la fruticultura a nivel mundial. Esta familia se encuentra en las regiones templadas, subtropicales y tropicales de todo el mundo, pero están ausentes en las zonas polares. Dentro de la familia Tephritidae, se encuentra el género *Anastrepha*, el cual es uno de los de mayor impacto económico en América (Hernández-Ortiz, Guillén-Aguilar, & López, 2010).

Se destaca la mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), cuya distribución se extiende desde el sur de Texas (EE.UU) a través de México, Centro y Sudamérica (Hernández-Ortiz & Morales-Valles, 2004). En Ecuador, *Anastrepha fraterculus* constituye uno de los principales problemas fitosanitarios en el sector frutícola en el país (Paucar, 2015).

Los daños que ocasiona la mosca de la fruta son: destrucción de la pulpa, disminución de su valor comercial, facilidad al ataque de patógenos y disminución de la producción de fruta. Además ocasiona incremento de costos de producción por la aplicación de medidas de control, gastos en investigación para el desarrollo de tecnología de control, afectan el comercio nacional y restringen el ingreso a mercados internacionales, ya que varias especies son de interés cuarentenario para países importadores de fruta fresca (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010).

Para combatir esta plaga, existen tipos de controles, como químico, natural, biológico, físico, entre otros; uno de los más estudiados en los últimos años es el control

biológico. Dentro del control biológico, se encuentran un gran número de microorganismos, hongos, levaduras, actinomicetos, y bacterias que han sido reportadas como benéficos por su capacidad de ser insecticidas, promotores de crecimiento vegetal, antagonistas de fitopatógenos y mejorar la protección de las plantas. Los hongos entomopatógenos han sido estudiados en los últimos 20 años por sus propiedades para el control de tefrítidos, su modo de acción por contacto, por vía tegumentaria, facilidad de producción en masa, así como su capacidad de producir compuestos con capacidad insecticida por ingestión, y su compatibilidad con el medioambiente (Lozano, 2015).

El grupo más importante de hongos entomopatógenos son los deuteromicetos, donde se encuentran: *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarhizium*, entre otros (Castellanos et al. 2011). *Metarhizium anisopliae* ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, que al inicio es blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula. Debido a las características de la cepa, ámbito de hospedantes, patogenicidad, virulencia y condiciones ambientales, existen cepas específicas para el control de diferentes plagas (Castillo, 2006).

1.1 Formulación del problema

La mosca de la fruta provoca graves estragos económicos porque el producto queda prácticamente inutilizable, llevando a los grandes mercados (países importadores) a imponer restricciones cuarentenarias, normas sanitarias y fitosanitarias que en su mayoría son difíciles de cumplir por parte de los productores, debido a que no todos poseen el mismo nivel de tecnología, financiamiento y conocimiento del cultivo. En Ecuador la mosca de la fruta afecta a frutales como guayaba, café, chirimoya, mandarina, entre otros. El principal problema de esta plaga es que es cuarentenaria en mercados como Chile y Estados Unidos, quienes piden medidas extremas para aceptar nuestras frutas (Valenzuela, 2012).

El cultivo que es atacado por esta plaga, sufre una importante reducción en su rendimiento, por ejemplo en el cultivo de naranja, la mosca de la fruta es una amenaza potencial, por el incremento de daños en los frutos en los últimos tiempos donde las plantas hospederas tienen una reducción en los rendimientos entre 10 a 50% (Ganchozo, 2015).

1.2 Justificación del problema

Las exportaciones que realizó el Ecuador al mundo, en el 2013, se ubicaron en 24.922 millones y las frutas representan el 9,9% de esas ventas. Lo que implica que es un sector muy importante para la economía del país, por los ingresos y la generación de empleo. La principal fruta es el banano que representó el 90% de las ventas. La diferencia se distribuye en la comercialización de mango, piñas, guayabas, melones, sandías, fresas, moras, grosellas y demás. Las frutas que poseen mayor potencial en los próximos años, son el mango y la piña (Macas, 2014).

Actualmente Ecuador exporta a países como Estados Unidos, México, Chile y países de la Unión Europea; estos mercados exigen el cumplimiento de normas de calidad para la exportación de frutas, específicamente que dichas frutas se encuentren libres de plagas. Por ejemplo, las exportaciones de banano de Ecuador enfrentan estándares (sanitarios y fitosanitarios, técnicos y de comercio) como: reglas laborales, requerimientos de certificación, los análisis de residuos, las etiquetas y las reglas medioambientales son los más importantes al momento de exportar el producto. El problema se basa en que estos estándares, de acuerdo a los bananeros, se tornan más numerosos y exigentes año a año (Wong, 2008).

En lo que se refiere a las reglas medioambientales, lo que se busca es implementar controles que sean efectivos y que minimicen o no causen daños al medio ambiente, es decir establecer un manejo integrado de plagas que conlleve varios controles, entre ellos el biológico, utilizando organismos vivos (como los hongos entomopatógenos) con el objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Evaluar la eficacia de *Metharizium anisopliae*, para el control de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en Guayllabamba, Ecuador.

1.3.2 Específicos

- Determinar la densidad poblacional de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en el suelo superficial (1 dm²) de un cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*)
- Evaluar la eficacia de control de tres concentraciones de *Metharizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

- Estudiar cualitativamente la aplicación de dos tipos de medio de cultivo PDA y Sabouraud en el aislamiento de *Metharizium anisopliae*
- Difundir los resultados obtenidos mediante el Repositorio Digital de la ESPE y en la comunidad de Guayllabamba

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades sobre la mosca de la fruta

2.1.1 Taxonomía

En el orden Díptera, se encuentran nueve familias relacionadas en tres clados: el primero contiene a los Lonchaeidae; el segundo incluye a los Richardiidae, Pallopteridae y Piophilidae; las familias incluidas en estos clados también se les ha denominado como Tephritoidea inferiores. El tercer clado contiene a los Ulidiidae (Otitidae), Platystomatidae, Tephritidae, Pyrgotidae y Tachiniscidae (Matheus, 2005).

Las verdaderas “moscas de la fruta” son insectos pertenecientes a la familia Tephritidae. El género *Anastrepha* es autóctono de Centro y Sudamérica. Las larvas se alimentan de la pulpa de las frutas, poseen metamorfosis completa, atravesando por los estados de huevo, larva, pupa y adulto (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010).

2.1.2 Ciclo biológico de la mosca de la fruta

El ciclo de vida de las moscas de la fruta (Figura 1), se inicia cuando las hembras adultas ovipositan bajo el pericarpio (cáscara) (Figura 2), el estado de huevo de las moscas de la fruta tiene una duración que está en función de las condiciones ambientales, varía de 2 a 7 días en verano y de 20 a 30 días en invierno, al final los huevos eclosionan y emergen las larvas (gusanos) las mismas que comienzan a alimentarse del fruto (Matheus, 2005).

Las larvas para su desarrollo y alimento, forman galerías en el sustrato de alimentación dejando a su paso excrementos que ocasionan la rápida descomposición del fruto, provocando su caída prematura. Después de mudar la piel dos veces, salen de las frutas realizando orificios con sus diminutas mandíbulas y se dejan caer al suelo, donde se introducen para pupar. El estado de larva dura de 1 a 3 semanas, de acuerdo a la especie de mosca y la temperatura del lugar (Figura 3) (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010).

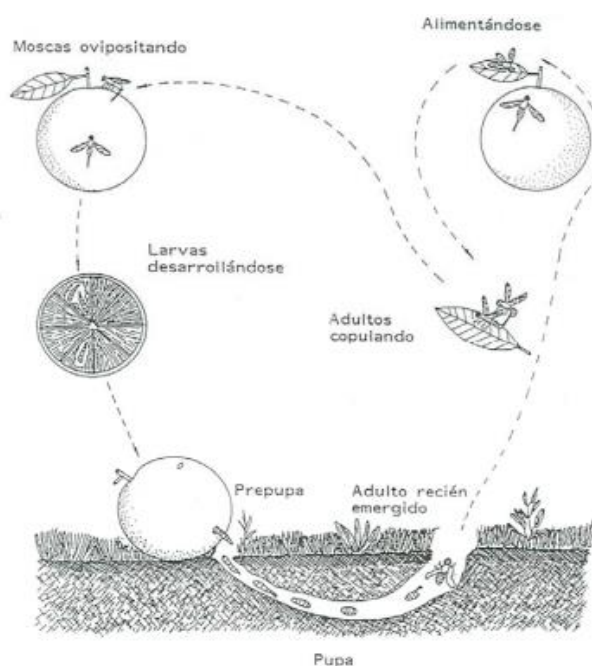


Figura 1 Ciclo de vida de la mosca de la fruta

Fuente (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010)



Figura 2 Oviposición de las moscas de la fruta

Fuente (Matheus, 2005)

El estado de pupa tiene una duración de 9-15 días, sin embargo durante el verano y en condiciones de baja temperatura se puede prolongar por meses (Figura 4). En esta fase ocurre la transformación progresiva de larva en adulto al interior del pupario. Una vez alcanzada su madurez fisiológica, el adulto emerge del pupario, rompiendo éste con el “ptilinum”, membrana ubicada en la parte frontal de la cabeza que se dilata para romper la piel del pupario y permitir la emergencia del adulto (Figura 5) (Matheus, 2005).



Figura 3 Larvas de la mosca de la fruta

Fuente (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010)



Figura 4 Pupas de moscas de la fruta del género *Anastrepha*

Fuente (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010)



Figura 5 Adulto emergiendo de la pupa, nótese el ptilinum aún presente

Fuente (Alarcón, 2017)

El adulto tiene el cuerpo amarillo, naranja, café o negro; se encuentra cubierto de pelos o cerdas, cabeza grande y ancha, recta o inclinada hacia atrás; ojos grandes, de color generalmente verde luminoso o violeta; ocelos y cerdas ocelares presentes o ausentes; antenas de tipo decumbente que forman tres segmentos, son cortas y pre-

sentan aristas, aparato bucal con probóscide corta, carnosa y con labella grande (Matheus, 2005).

El tiempo de vida de un adulto es de uno a dos meses, según las condiciones ecológicas, aunque se puede prolongar hasta por 10 meses en zonas templadas y frías. No todas las plantas y árboles sirven como hospederos y refugios a las moscas de la fruta; algunas especies las utilizan como hospederos, otras como refugio y otras para ambos propósitos (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010).



Figura 6 Adulto hembra de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

Fuente (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010)

2.2 Generalidades del cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*)

La Feijoa (*Acca sellowiana*), es un arbusto leñoso de la familia Myrtaceae nativa de Sudamérica, donde es conocida como guayabo del Brasil. Actualmente se cultiva, en España, Francia, Italia, EEUU (en California) y Nueva Zelanda, por su fruto y su valor ornamental. El fruto es una baya verde grisácea, de forma casi redondeada según el cultivar, su peso oscila entre 60 y 150 g, aunque algunos frutos pueden superar los 200 g. La pulpa del fruto es blanquecina, jugosa, aromática y de sabor agradable, posee un elevado contenido en sales minerales, especialmente en yodo. La maduración ocurre en otoño (Vela et al. 2009).

El momento de la recolección es uno de los aspectos más conflictivos de este cultivo, en cada árbol existen frutos en distintos grados de maduración. La fruta madu-

ra cae al suelo de manera escalonada, durante aproximadamente un mes, lo que obliga a recogerla varias veces por semana. La producción por planta puede superar los 40 kilos de fruta a partir del décimo año (Vela et al. 2009).



Figura 7 Feijoa (*Acca sellowiana*)

Fuente (Valdez, 2011)

2.2.1 Ataque de mosca de la fruta en cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*)

En el Ecuador se ha reportado ataque de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en Feijoa, en las localidades de Guayllabamba y Patate (Tigrero, 2009).

Los daños directos de la mosca de la fruta son: destrucción de la pulpa, disminución de su valor, facilidad al ataque de patógenos y disminución de la producción de fruta (Vilatuña, Sandoval, & Tigrero, 2010).

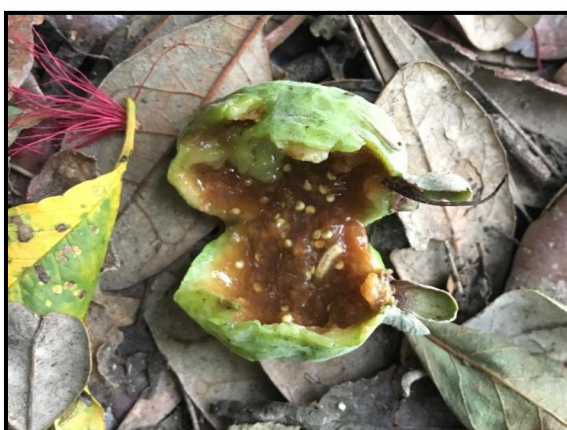


Figura 8 Larva de *Anastrepha fraterculus* en fruto de Feijoa (*Acca sellowiana*)

Fuente (Alarcón, 2016)

2.3 Control biológico

El control biológico es una práctica muy importante para el manejo de plagas, consiste en la utilización de organismos vivos para reducir y mantener la abundancia poblacional de una plaga por debajo de los niveles de daño económico. Su valor recae en que puede resultar en un control eficiente de una plaga tanto a mediano como a largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable (Fischbein, 2012).

2.3.1 Tipos de control biológico

Existen tres tipos de control biológico: clásico, aumentativo y el conservativo (Fischbein, 2012). El control biológico clásico se basa en la introducción de un enemigo natural en un nuevo ambiente para que se establezca de forma permanente y regule a la plaga de manera sostenida en el tiempo; el control biológico aumentativo contribuye a aumentar la abundancia de los enemigos naturales que ya están presentes en un área afectada así como también la liberación periódica de enemigos naturales ausentes en la zona afectada; el control biológico conservativo señala a implementar varias medidas para proteger, aumentar la abundancia y mejorar las actividades de los enemigos naturales ya presentes en el área (Fischbein, 2012).

Los diferentes métodos de control biológico, pueden combinarse con otros tipos de control, dentro de un plan de manejo integrado de plagas. El manejo integrado de plagas (MIP) es una estrategia que integra las diferentes tácticas normalmente empleadas en el control de plagas, entre las cuales: control mecánico, físico, cultural, biológico, genético y químico de la plaga; por ejemplo se pueden combinar actividades de manejo silvícola y sanitario de las plantas o árboles de cultivo (podas, raleos silvícola, raleo sanitario), manejo biológico mediante enemigos naturales (depredadores, parasitoides, patógenos) y control químico (uso de plaguicidas) (Fischbein, 2012).

2.3.2 Uso de entomopatógenos en el control biológico

Los hongos entomopatógenos tienen mecanismos de invasión únicos, ya que no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo sino que lo infecta por contacto y adhesión de las esporas a partes de su cuerpo (partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos, entre otros), evitando que el hospedero desarrolle resistencia (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

Constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos considerados como plaga, principalmente en los chupadores o succionadores ya que estos no pueden ingerir patógenos que infectan a través del tracto digestivo (Castillo, 2006).

Los hongos entomopatógenos, forman un grupo con más de 750 especies, disgregados en el medio ambiente. Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akantomycetes*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

2.3.3 Medios para el aislamiento de hongos entomopatógenos

2.3.3.1 Sabouraud

Fórmula original desarrollada por Raymond Sabouraud, es el medio de cultivo más utilizado en el estudio de hongos, parcialmente selectivo debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa. En este medio las peptonas proveen la fuente de carbono y nitrógeno para el adecuado crecimiento de microorganismos, la dextrosa actúa como fuente de energía y el agar es agregado como agente solidificante (Maldonado, 2013). Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos (Cañedo & Ames, 2004).

2.3.3.2 Dodine

En 1982, el fungicida Dodine (monoacetato de N-dodecilguanidina) fue aplicado en un medio de cultivo para el aislamiento de *M. anisopliae* de suelo. Se determinó que Dodine puede ser utilizado ampliamente en el aislamiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae*; se estableció que la adición de bajas concentraciones de Dodine (10 y 50 µg / ml) al medio, ayuda a reducir el número de contaminantes en más del 90% y mejora el aislamiento (Fernandes, Keyser, & Rangel, 2010).

2.3.3.3 Papa Dextrosa Agar (PDA)

El Agar Papa Dextrosa se encuentra compuesto por infusión de papa deshidratada y Dextrosa, este medio fomenta el crecimiento exuberante de los hongos (Acumedia, 2015). Es un medio muy usado que sirve para aislar una diversidad de hongos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* y *Metarhizium*, los más importantes hongos

parásitos de insectos; al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos, crecen y esporulan muy bien en este medio. Cuando se aíslan hongos a partir de insectos colectados del suelo, es recomendable acidificar el medio con ácido láctico al 25%. También se recomienda agregar 3 ó 4 gotas sobre el agar solidificado de la placa con el objeto de evitar el desarrollo de bacterias (Cañedo & Ames, 2004).

2.4 Generalidades de *Metarhizium anisopliae*

Se encuentra en la naturaleza, en rastrojos de cultivos, en el suelo, las plantas, estiércol, animales atacados por el hongo, etc., logra buen desarrollo en lugares con poco sol, frescos, y húmedos. Ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes; los insectos muertos por este hongo se presentan cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Figura 9) (Castillo, 2006). En su aspecto macroscópico, presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino (Figura 10) (González-Castillo, Aguilar, & Rodríguez-Herrera, 2012).



Figura 9 Cadáver de chinche del tallo del arroz, *Tibraca limbativentris*, muerto por *Metarhizium anisopliae*
Fuente (Lecuona & Kruger, 2014)

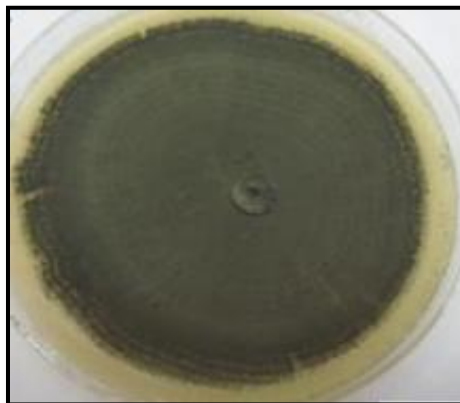


Figura 10 Aspecto macroscópico de *Metarhizium anisopliae*

Fuente (García, 2012)

2.4.1 Efectividad de *Metharizium anisopliae*

Según Gómez (1999), el primer trabajo de control de plagas utilizando microorganismos, fue realizado en Rusia en 1879 por Metschnikoff donde se utilizó *M. anisopliae* para el control de *Anisoplia austriaca* Herbst, importante plaga de la remolacha; este hongo se ha aislado de más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de importancia agrícola. Según Mendonça (1991) citado por Gómez (1999), *Metharizium anisopliae* es usado en gran escala en Brasil para el control del “salivazo de la caña de azúcar” *Manaharva andigena*, desde el año 1970. Según Alves (1986) citado por Gómez (1999), en 1984 se aplicó *Metharizium anisopliae* en 150.000 ha de caña de azúcar para el control de *M. posticata*, reduciéndose el empleo de insecticidas químicos, esto fue de gran importancia para el desempeño de los enemigos naturales del barrenador de la caña de azúcar.

2.4.2 Características

En su aspecto microscópico, *M. anisopliae*, presenta células conidiógenas (fiálicas) de forma cilíndrica, con ápices redondeados o cónicos y están arreglados en densos himenios. Los conidióforos son ramificados reiteradamente formando una estructura semejante a un candelabro. Los conidios son cilíndricos, ovoides u aceptados, forman cadenas usualmente arregladas en columnas prismáticas. Los conidios miden de 3.5 a 9 μm (Carballo & Guaharay, 2004).



Figura 11 Aspecto microscópico de *Metarhizium anisopliae*

Fuente (Alarcón, 2016)

2.4.3 Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*

Los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases en el insecto hospedero: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. Inicialmente, la espora se adhiere a la cutícula del insecto, posteriormente desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del hospedero. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación (Castillo, 2006).

En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción de enzimas como: proteasas, quitinasas y lipasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación (Castillo, 2006).

2.4.4 Toxinas

Metarhizium anisopliae produce varias toxinas entre ellas los ciclodepsipeptidos como las dextruxinas A, B, C, D y la desmetildextruxina B, son compuestos tóxicos para los insectos por inyección intrahemocélica y su efecto tóxico varía con la especie de insecto (Carballo & Guaharay, 2004).

2.4.5 Profundidad de ataque de *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae se encuentra mejor adaptado a condiciones del suelo; se lo emplea ampliamente en el control de plagas a nivel de la rizósfera (Jaramillo et al. 2015). Una vez madura, la larva de la mosca de la fruta, abandona el fruto y se entierra a pocos centímetros de profundidad (4-8 cm), se convierte en pupa; después de algún tiempo, emerge el adulto que iniciará un nuevo ciclo de vida (Boscán, 1992). Las pupas de la mosca de la fruta, al encontrarse a nivel de la rizósfera es decir, la parte del suelo inmediata a las raíces vivas, se convierten en un elemento susceptible al ataque de *Metarhizium anisopliae*.

2.4.6 Concentraciones para aplicación de *Metarhizium anisopliae*

Para la aplicación de *Metarhizium anisopliae*, las concentraciones recomendadas son:

- 1×10^6 UFC
- 1×10^7 UFC
- 1×10^8 UFC

(Rodríguez, France, & Gerding, 2004)

2.5 *Fusarium* sp.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (2003) citado por Motta-Delgado & Murcia- Ordoñez (2011) los géneros de entomopatógenos más utilizados son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium*. Pérez Kepp (2013) tras estudios realizados afirma que *Fusarium* sp., afecta algunos insectos considerados plagas tradicionales del cultivo de maíz: en larvas de *Spodoptera frugiperda*, y en adultos de *Peregrinus maidis*, *Rhopalosiphum maidis* y *Chaectognema macgillavryi*, también en los dípteros como *Euxesta* sp.

2.6 *Aspergillus* sp.

Aspergillus es un hongo filamentoso saprofito, hialino, , perteneciente al filo Ascomycota. Este hongo se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios). Se lo reconoce como uno de los principales hongos productores de micotoxinas que son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos (Databio, 2012).

Cabe mencionar que estudios demuestran que *Aspergillus parasiticus* puede afectar a moscas y adultos de *Spodoptera frugiperda* (Pérez Kepp, 2013).

2.7 *Beauveria* sp.

El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) se ha estudiado como agente de control de insectos plagas pertenecientes a diferentes órdenes. En cultivos de la agricultura urbana lo recomendaron para el control de varias especies que afectan a muchos cultivos hortícolas (Arias López et al. 2014).

En condiciones de laboratorio *Beauveria bassiana* es patógena para la mosca de fruta *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda*, alcanzando porcentajes de colonización del 100% (Arias López et al. 2014).

2.8 *Rhizoctonia* sp.

Mora (1996) menciona que *Rhizoctonia* sp., es un patógeno que posee un amplio rango de hospederos el cual ataca a los hipocótilos, la raíz y las hojas de la planta. No se han registrado estudios que demuestren que *Rhizoctonia* sp., actúe como entomopatógeno.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de la investigación

3.1.1 Ubicación Política

El trabajo de campo se lo realizó en el vivero frutal del Ing. Raúl Morales, ubicado en la parroquia de Guayllabamba, cuya ubicación es la siguiente:

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Límites:

Norte: cantón Pedro Moncayo

Sur: parroquias de El Quinche, Yaruquí y Tababela

Este: cantón Cayambe

Oeste: cantón Cayambe

El trabajo de laboratorio se lo realizó en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA 1, sede Hda. El Prado, en el Laboratorio de Entomología cuya ubicación es la siguiente:

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: Sangolquí

3.1.2 Ubicación Geográfica

Guayllabamba, vivero frutal del Ing. Raúl Morales:

Latitud: 0°03'29.4" (S)

Longitud: 78°20'41.0" (O)

(Figura 12)

IASA 1, Laboratorio de Entomología

Latitud 0°23'11.49" (S)

Longitud 78°24'57.95" (O)

(Figura 13)

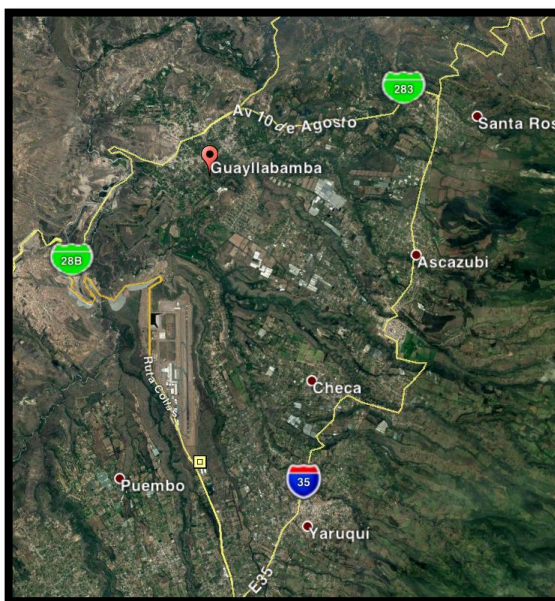


Figura 12 Mapa de la parroquia de Guayllabamba
Fuente (Maps, 2017)

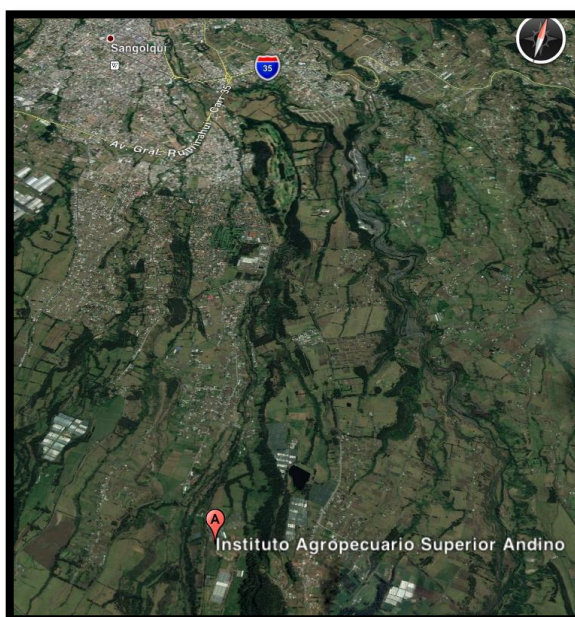


Figura 13 Mapa IASA 1
Fuente (Maps, 2017)

3.1.3 Ubicación Ecológica

Guayllabamba, vivero frutal del Ing. Raúl Morales:

Altitud: 1620 m.s.n.m.

Temperatura media: 15 °C

Precipitación anual: 375 mm

Zona ecológica: Estepa espinosa Montano Bajo

Región: Seco temperado

(Cañadas, 1983)

IASA 1, Laboratorio de Entomología:

Altitud: 2728 m.s.n.m

Temperatura media: 16.35 °C

Precipitación anual: 1270 mm

Zona ecológica: Bosque montano bajo

Región: Templada

(Arce, 2009)

3.2 Materiales

3.2.1 Material experimental

- Salivazo (*Mahanarva andigena*) de la caña de azúcar infestado de *Metarhizium anisopliae*
- Cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*)
- Pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)
- Sacabocados
- Estéreo microscopio
- Microscopio
- Autoclave
- Micropipeta
- Cámara de flujo laminar
- Asa de inoculación
- Medios de cultivo PDA y Sabouraud
- Dodine
- Balanza
- Arroz

- Fundas de polipropileno
- Cámara de Neubauer
- Pinzas
- Mechero

3.2.2 Material complementario

- Recipientes plásticos
- Letreros
- Regla
- Libreta de campo
- Bandejas plásticas
- Colador
- Espátula metálica
- Cámara fotográfica semi-profesional Sony®
- Mini laptop HP
- Esferos

3.3 Métodos

3.3.1 Diseño experimental

3.3.1.1 Factores a probar

Factor 1: tipos de medio de cultivo para el aislamiento de *M. anisopliae*

Sabouraud

PDA

Factor 2: concentraciones de *M. anisopliae* más un testigo

Concentración 1: 1×10^6

Concentración 2: 1×10^7

Concentración 3: 1×10^8

3.3.1.2 Tratamientos

El factor tipos de medios de cultivo, al ser analizado de manera cualitativa en condiciones de laboratorio, no se incluyó en las interacciones entre factores, de manera que los tratamientos fueron las diferentes concentraciones de *M. anisopliae* que se aplicaron en campo:

T1= 1×10^6

$$T2= 1 \times 10^7$$

$$T3= 1 \times 10^8$$

T4= Testigo

3.3.1.3 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), sin embargo para el análisis estadístico se ajustó a un modelo de covarianza, cuyo modelo matemático fue:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + B(X_{ij} - \bar{x}_{.}) + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : % de eficacia de *Metarhizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

μ = media general

C_i = efecto de la i -ésima concentración de *Metarhizium anisopliae*

X_{ij} = número de pupas vivas iniciales

\bar{x} = media general del número de pupas vivas iniciales

B = coeficiente de regresión lineal

e_{ij} = error experimental

3.3.1.4 Diseño en campo

El establecimiento del experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), con tres repeticiones, se obtuvo un total de 12 unidades experimentales.

3.3.1.5 Características de la unidad experimental

En el cultivo de Feijoa, se determinó que la unidad experimental fue un área de 1 dm², delimitada bajo cada fruto caído en suelo, el cual presentó orificios en su superficie y un avanzado estado de descomposición, corroborando la existencia de pupas de *A. fraterculus* bajo el suelo.

3.3.2 Métodos específicos de manejo del experimento

Determinación de densidad poblacional de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

- En el cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*), que posee una edad de 12 años, se aleatorizaron los tratamientos (1 x 10⁶ UFC, 1 x 10⁷ UFC, 1 x 10⁸ UFC y un Testigo), luego de lo cual se procedió con su respectiva identificación.

- Con la ayuda de un sacabocados (elaborado en acero inoxidable), de cada tratamiento se obtuvo aleatoriamente tres muestras de suelo de (9 x 9 x 9) cm, las cuales fueron almacenadas y etiquetadas en recipientes plásticos (19 x 10 x 8) cm.
- Cada muestra se trasladó al Laboratorio de Entomología (Hda. El Prado) para su análisis.
- Cuidadosamente con la ayuda de una espátula metálica de manera transversal, cada muestra fue fraccionada en tres partes: 0-3cm, 3.1-6 cm y 6.1-9 cm, para facilitar el análisis de profundidad a la que se encuentran las pupas; posteriormente cada parte se desmenuzó en un colador y se realizó el conteo de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Tigrero, 2016).

Evaluación de la eficacia de control de tres concentraciones de *Metharizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

Para poder evaluar la eficacia de *Metharizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), se partió desde la búsqueda del hongo entomopatógeno en organismos que pudieran alojarlo, el aislamiento del hongo encontrado y la comprobación taxonómica que demuestre que se encontró *Metharizium anisopliae*, para lo cual:

- Se realizó una visita en la Asociación “Flor de Caña”, ubicada en la localidad de Palo Quemado, vía Santo Domingo, para recolectar insectos que pudieran estar infectados con hongos entomopatógenos, entre ellos *Metarhizium anisopliae*.
- Se obtuvieron en las plantas de caña de azúcar salivazos (*Mahanarva andigena*) que visualmente parecían infectados con *Metarhizium anisopliae*, y se procedió a su respectivo etiquetado y almacenamiento en cámara húmeda.
- Las muestras recogidas fueron trasladadas al Laboratorio de Entomología, IASA 1.
- Para verificar que *Metarhizium anisopliae* fue el hongo encontrado en el salivazo, se procedió al aislamiento del mismo en medio PDA.
- Se emplearon 9,75 gr PDA que fueron disueltos en un vaso de precipitación que contenía 250 ml de agua destilada, posteriormente se autoclavó la solución durante una hora.

- En cámara de flujo laminar, se vertió la solución en cajas Petri y se procedió a sembrar el hongo con la ayuda de un asa de inoculación, haciendo un pequeño raspado en la superficie del mismo.
- Las cajas fueron expuestas al mechero, selladas con plástico adherente, identificadas y almacenadas en la incubadora a una temperatura aproximada de 25 °C.
- Transcurridos de 8 a 15 días se pudo observar la esporulación del hongo y comprobar que se trata de *Metarhizium anisopliae*.

Tras verificar que el hongo aislado del salivazo (*Mahanarva andigena*), fue *Metarhizium anisopliae*, se realizó el protocolo requerido antes de su aplicación en el campo:

Purificación 1:

- Se emplearon dos tipos de medios PDA y Sabouraud, se disolvieron 9,75 gr y 16,25 gr respectivamente, en dos vasos de precipitación que contenían 250 ml de agua destilada.
- Se dispusieron las soluciones en dos matraces de Erlenmeyer, y se autoclavaron durante una hora. Transcurrido el tiempo, en cámara de flujo laminar, se aplicó una pequeña cantidad de antibiótico en cada matraz para evitar el crecimiento de bacterias.
- Posteriormente se vertieron las soluciones en cajas Petri y se esperó hasta que la preparación esté sólida.
- Para la utilización de Dodine, las soluciones se enfriaron a 40 °C, y se vertieron 100 microlitros de Dodine por cada 250 ml de solución.
- Se empleó la técnica del palillo esterilizado con el cual, mediante un raspado en el hongo encontrado en el insecto se obtuvo una muestra que se depositó en las cajas Petri y se dejó incubar durante 8 días.

Purificación 2:

- Se purificaron las cepas obtenidas en un medio PDA (proceso descrito en la purificación 1) y se incubaron por un lapso de 15 días, con luz tenue que favoreció la esporulación.

Siguiendo los postulados de Koch (Fuentes, 2007):

- Se recolectaron pupas de la familia Noctuidae

- Las pupas fueron desinfectadas en alcohol al 2% y sumergidas en una emulsión compuesta de 2 ml de aceite vegetal, 100 ml de agua y una gota de Tween.
- Las pupas se colocaron en cajas Petri que contenían el hongo purificado y esporulado, aproximadamente a los 8 días se observó el crecimiento del hongo en las pupas.

Masificación del hongo:

- Una vez potencializada la cepa purificada, se procedió a su masificación en arroz, para esto, se emplearon alrededor de 4 libras de arroz crudo las mismas que fueron remojadas en agua destilada durante 30 minutos.
 - Se escurrió el arroz y se empacaron 100 gr por cada funda de polipropileno, adicionalmente se colocó 100 ml de agua destilada en un vaso de precipitación. Las fundas con arroz y el vaso se autoclavaron durante 30 minutos.
 - En cámara de flujo laminar, en el vaso de precipitación con la ayuda de un asa de inoculación, se realizaron raspados de la cepa purificada y se adicionó una gota de Tween.
 - En cada funda con arroz y con la ayuda de una jeringa esterilizada, se inyectaron 2 ml de la solución previamente realizada en el vaso de precipitación, la abertura fue sellada con cinta adhesiva.
 - Las fundas se colocaron en la incubadora a una temperatura de 25 °C durante 15 días, tiempo en el cual se completa el proceso de esporulación.

Preparación de las concentraciones de *Metarhizium anisopliae*:

- Transcurridos los 15 días de la esporulación del hongo se procedió a preparar las concentraciones que fueron aplicadas en el campo.
 - Se colocó un gramo de arroz del hongo esporulado en un vaso de precipitación, se añadieron 10 ml de agua destilada, constituyendo la suspensión madre.
 - De la suspensión madre se tomó 1 ml y se colocó en un segundo vaso de precipitación que contenía 9 ml de agua destilada, así se preparó la dilución de 1×10^{-1} .
 - El procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 1×10^{-3} , la que permitió contar el número de conidias en la cámara de Neubauer.

- El conteo de conidias se realizó en cinco campos (los cuatro de las esquinas y el central) de la cámara de Neubauer, se sumó la cantidad total de los cinco campos y se obtuvo el promedio.

- Este valor se multiplicó por 50.000 que es el factor de la cámara, por el inverso de la dilución, que en este caso fue 10^3 y por el volumen de la suspensión madre (10 ml). Este valor fue el estimado del número de conidias por gramo de arroz. (Gómez & Mendoza, 2004).

- De la última dilución en la cual se obtuvo el valor de 1×10^9 se realizaron tres diluciones más siguiendo el proceso anteriormente descrito, más hasta obtener la concentración de 1×10^6 .

- Así se obtuvieron las tres concentraciones 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 , las cuales fueron almacenadas en botellas plásticas etiquetados con el tratamiento respectivo. Para el testigo se utilizó únicamente agua destilada.

- Se aforó el contenido en cada botella a 50 ml (Jaramillo *et al*, 2015).

- Se realizaron pequeños orificios en los tapones de cada botella, para facilitar la aplicación, a manera de regadera.

Aplicación de *Metarhizium anisopliae* en el campo:

- Previo a la aplicación de las concentraciones en campo, se realizó una inspección visual de los frutos de Feijoa encontrados en el suelo, para determinar los sitios precisos donde se encontraban las pupas de *Anastrepha fraterculus*; es decir, bajo los frutos que presentaron orificios en su superficie y un avanzado estado de descomposición.

- Junto a cada fruto escogido (12 en total) se colocaron las respectivas identificaciones de cada tratamiento.

- Una vez identificado los sitios, los tratamientos fueron aplicados (retirando el fruto y las hojas que pudieran encontrarse en el suelo) desde cada botella a manera de regadera asegurándonos mojar muy bien la superficie que fue analizada: 1 dm^2 .

- Transcurridos 13 días de la aplicación en campo, con la ayuda del sacabocados, se extrajeron 12 muestras correspondientes a los tratamientos con sus repeticiones, las mismas que fueron almacenadas en recipientes plásticos con su respectivo etiquetado.

- Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Entomología para su análisis.

Análisis de muestras:

- Cuidadosamente con la ayuda de una espátula metálica de manera transversal, cada muestra fue fraccionada en una bandeja plástica en tres partes: 0-3cm, 3.1-6 cm y 6.1-9 cm, para facilitar su análisis; posteriormente cada parte se desmenuzó en un colador y las pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) se colocaron en cajas Petri (12 cajas) etiquetadas respectivamente junto con algodón humedecido para favorecer el desarrollo del hongo en un ambiente húmedo (Tigrero, 2016).
- Transcurridos 16 días, tiempo en el cual se observó un notable crecimiento de hongos en las pupas, se procedió a tomar fotografías de los resultados obtenidos.
- Siguiendo los Postulados de Koch (Fuentes, 2007), se realizaron aislamientos en medio PDA de los resultados obtenidos en cada tratamiento, para corroborar que las pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) se encontraban contaminadas con *Metharizium anisopliae*.

Evaluación cualitativa de los dos tipos de medio de cultivo, PDA y Sabouraud en el aislamiento de *Metharizium anisopliae*:

- Los medios PDA y Sabouraud, se disolvieron 9,75 gr y 16,25 gr respectivamente, en dos vasos de precipitación que contenían 250 ml de agua destilada.
- Se dispusieron las soluciones en un matraz de Erlenmeyer, y se autoclavaron durante una hora.
- Posteriormente en cámara de flujo laminar, se vertieron las soluciones en cajas Petri y se esperó hasta que la preparación esté sólida.
- Se procedió a sembrar el hongo con la ayuda de un asa de inoculación, haciendo un pequeño raspado en la superficie del mismo.
- Las cajas fueron expuestas al mechero, selladas con plástico adherente, identificadas y almacenadas en la incubadora a una temperatura aproximada de 25 °C.
- Día a día se realizó una evaluación visual de las cajas, para determinar diferencias del crecimiento del hongo en los dos tipos de medio.

Difusión de los resultados obtenidos mediante el Repositorio Digital de la ESPE y en la comunidad de Guayllabamba

- El trabajo de titulación se difundió mediante el Repositorio Digital de la ESPE, y al Ing. Raúl Morales propietario del vivero “Oro Verde” donde se realizó la investigación, se le proporcionó una copia digital del trabajo.

3.3.3 Análisis estadístico

3.3.3.1 Esquema del análisis de covarianza

Se realizó un análisis de covarianza para el factor concentraciones (tabla 1):

Tabla 1
Análisis de covarianza

FUENTE DE VARIACIÓN	DESGLOSE GRADOS DE LIBERTAD	GRADOS DE LIBERTAD
Total	12-1=11	11
Tratamientos	4-1= 3	3
Pupas vivas iniciales	1	1
Error	6	6

Nota: los grados de libertad de la covariable (pupas vivas iniciales) por definición es 1.

3.3.3.2 Variables evaluadas

Variable dependiente: número de pupas infectadas por las concentraciones *Metarhizium anisopliae*.

Variables independientes: porcentaje de eficacia de *Metarhizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), densidad poblacional inicial de pupas *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en el suelo superficial (0-10 cm de profundidad).

3.3.3.3 Tipo de análisis estadístico

Con ayuda del programa estadístico InfoStat, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) de las variables evaluadas. Las medias obtenidas de los tratamientos fueron evaluadas mediante el procedimiento de comparaciones de medias de Duncan a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Determinación de la densidad poblacional inicial de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), en el suelo superficial (entre 0-10 cm de profundidad) de un cultivo de Feijoa (*Acca sellowiana*):

La distribución de pupas en la capa de suelo analizada (tabla 2), no presenta una distribución normal, esto se debe a que en el caso de los insectos, es más común una distribución agregada, es decir cuando se acumulan en mayor o menor cantidad, en determinados focos o sitios (Nakano, Silveira, & Zucchi, 1981).

Tabla 2
Población inicial de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), en los diferentes tratamientos, en el suelo superficial (entre 0-10 cm de profundidad)

NÚMERO DE PUPAS DE <i>Anastrepha fraterculus</i>									
TRATAMIENTOS	REPETICIÓN 1			REPETICIÓN 2			REPETICIÓN 3		
	SEGMENTOS			SEGMENTOS			SEGMENTOS		
	0 - 3 cm.	3.1 - 6 cm.	6.1 - 9 cm.	0 - 3 cm.	3.1 - 6 cm.	6.1 - 9 cm.	0 - 3 cm.	3.1 - 6 cm.	6.1 - 9 cm.
1. 1×10^6 UFC	1	0	1	0	1	1	5	0	0
2. 1×10^7 UFC	1	0	0	2	0	0	0	0	0
3. 1×10^8 UFC	18	4	1	1	4	0	0	0	0
TESTIGO	0	0	0	0	0	0	1	0	0

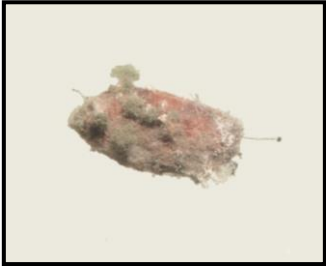
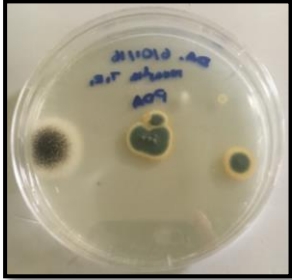

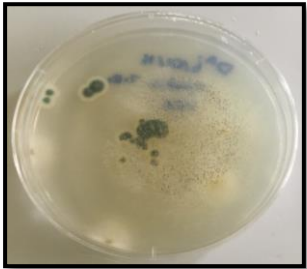

4.2 Evaluación de la eficacia de control de tres concentraciones de *Metharizium anisopliae* en pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)

Luego de 28 días de la aplicación de *M. anisopliae* en el suelo, los resultados obtenidos son los siguientes:

Primer tratamiento:

En la figura 14 se observa en la primera repetición que *M. anisopliae* infectó a una pupa (a), para corroborar el resultado, se realizó el aislamiento en medio PDA, obteniendo el desarrollo del hongo en cuestión (b); también se presentó el crecimiento de *Fusarium* sp. (c) y (d); en la segunda repetición no se registró infección (e); en la

tercera repetición se presentó el crecimiento de *Fusarium* sp. (g), y en otra pupa no se registró infección (h).

REPETICIÓN	RESULTADO
1	<div data-bbox="574 544 901 808"></div> <div data-bbox="735 840 748 866">a</div> <div data-bbox="1064 537 1356 815"></div> <div data-bbox="1198 840 1211 866">b</div> <div data-bbox="585 900 924 1167"></div> <div data-bbox="735 1182 748 1209">c</div> <div data-bbox="1048 900 1355 1167"></div> <div data-bbox="1198 1182 1211 1209">d</div>
2	<div data-bbox="777 1270 1125 1518"></div> <div data-bbox="943 1556 956 1583">e</div>

Continúa 

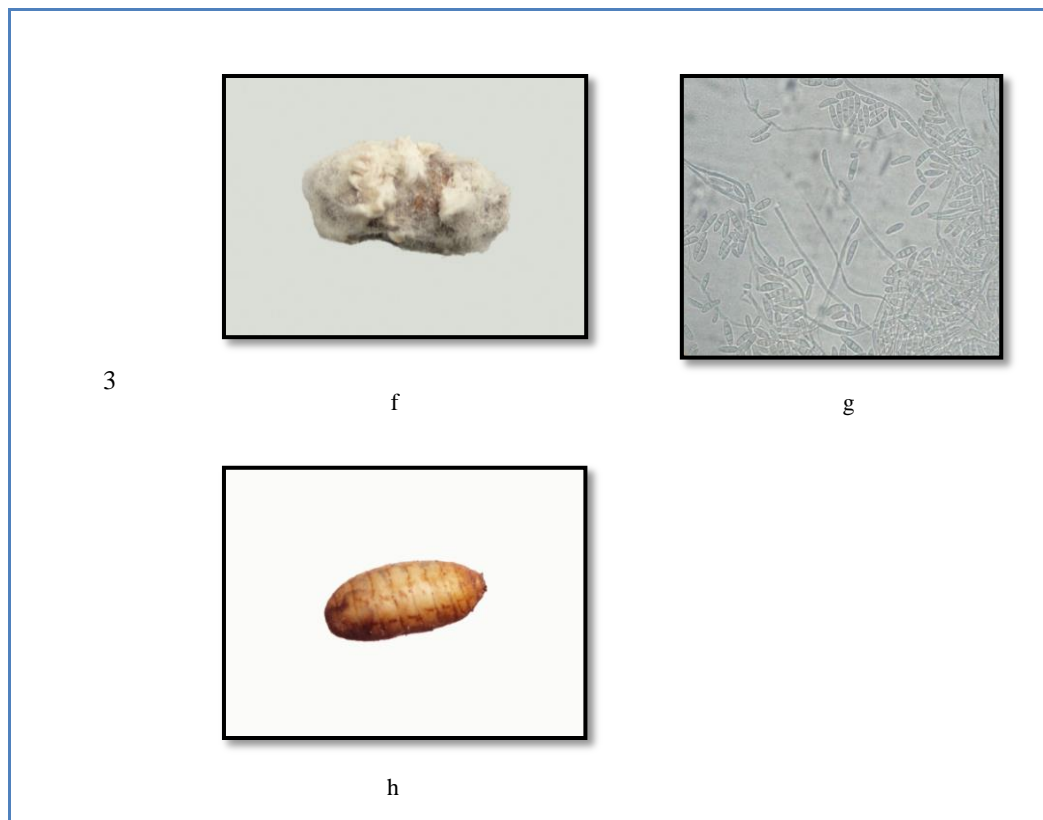


Figura 14 Resultados en el tratamiento 1: 1×10^6

Segundo tratamiento:

En la figura 15 se observa que no existió crecimiento de *M. anisopliae*; sin embargo se registró el crecimiento de hongos como: como *Aspergillus* sp. (a) y (b) en la primera repetición; *Fusarium* sp. (c) y (d) en la segunda repetición; en la tercera repetición no se registró infección por lo que las pupas eclosionaron (e).



Continúa 

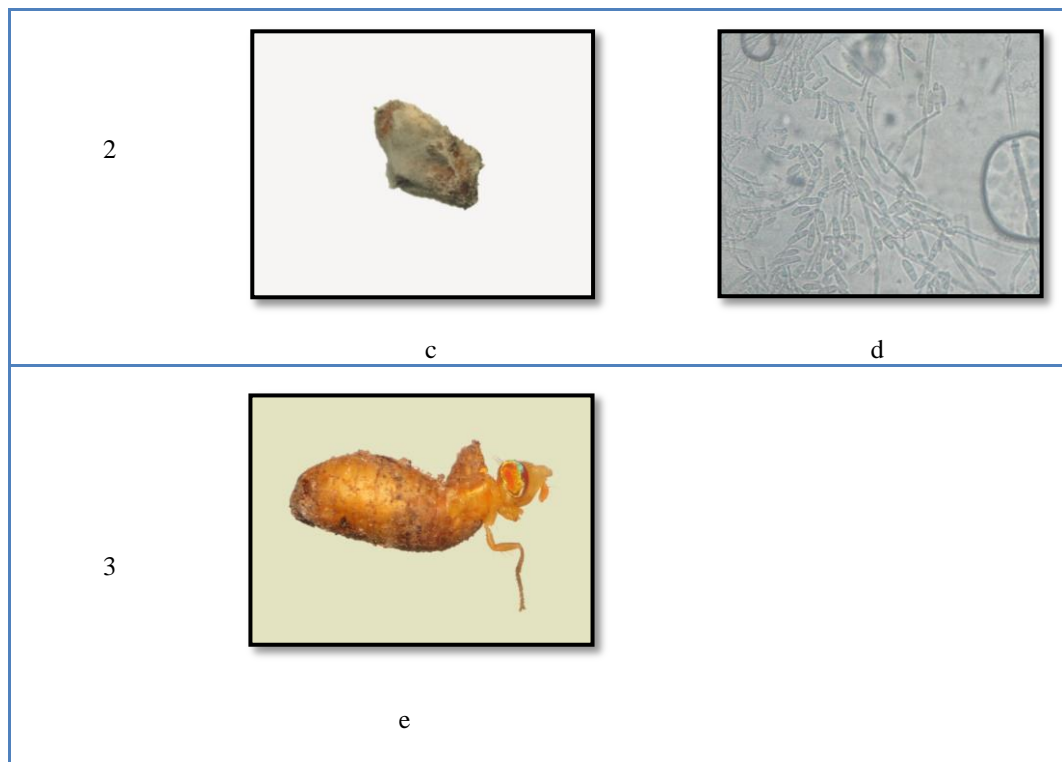

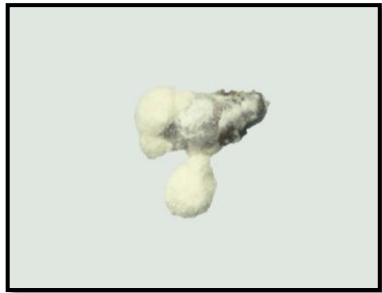


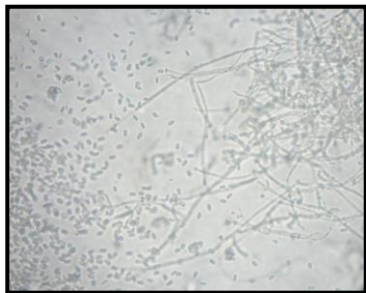


Figura 15 Resultados en el tratamiento 2: 1×10^7

Tercer tratamiento:

En la figura 16 se observa que no se presentó crecimiento de *M. anisopliae*; en la primera repetición una pupa no fue infectada (a) mientras que en las otras pupas se registró el crecimiento de hongos como: como *Rhizoctonia* sp. (b) y (c) en la primera repetición, *Beauveria* sp. (d) y (e) en la segunda repetición y *Fusarium* sp. en la tercera repetición (f) y (g).

REPETICIÓN	RESULTADOS
1	<p data-bbox="734 403 1125 683"></p> <p data-bbox="933 716 957 750">a</p> <p data-bbox="670 795 694 828">c</p> <p data-bbox="1141 795 1165 828">d</p> <p data-bbox="494 851 877 1142"></p> <p data-bbox="965 851 1316 1142"></p>
2	<p data-bbox="510 1220 909 1534"></p> <p data-bbox="702 1590 726 1624">d</p> <p data-bbox="949 1232 1316 1523"></p> <p data-bbox="1133 1590 1157 1624">e</p>

Continúa 

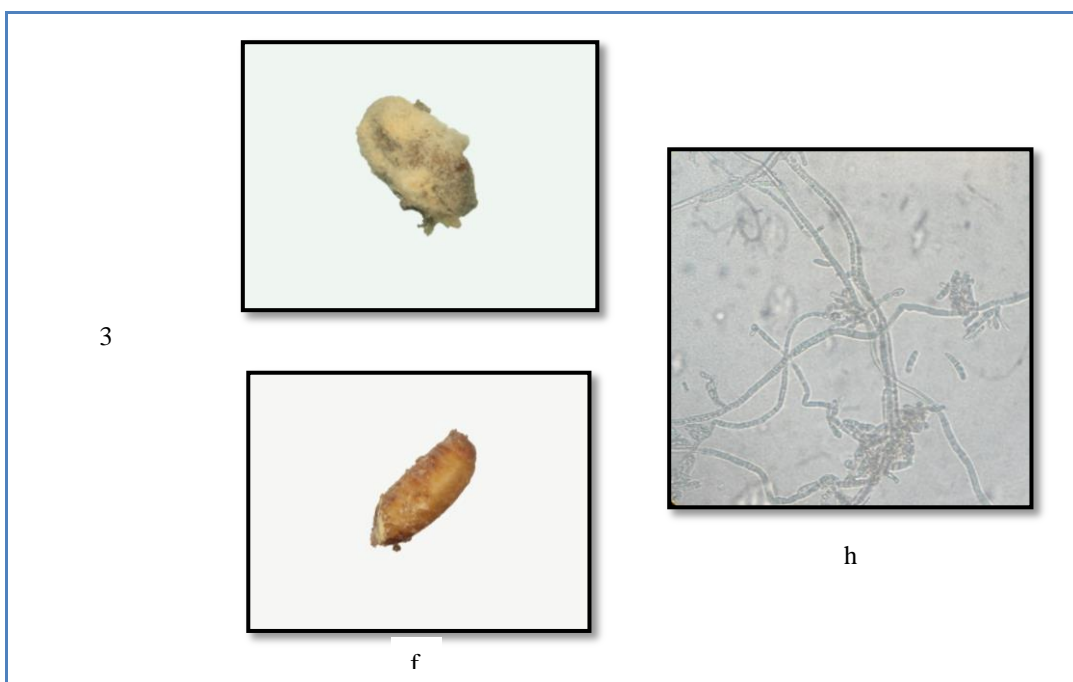




Figura 16 Resultados en el tratamiento 3: 1×10^8

Testigo:

Como se observa en la figura 17, no se registró infección en el testigo.

REPETICIÓN	RESULTADOS
1	
2	

Continúa 

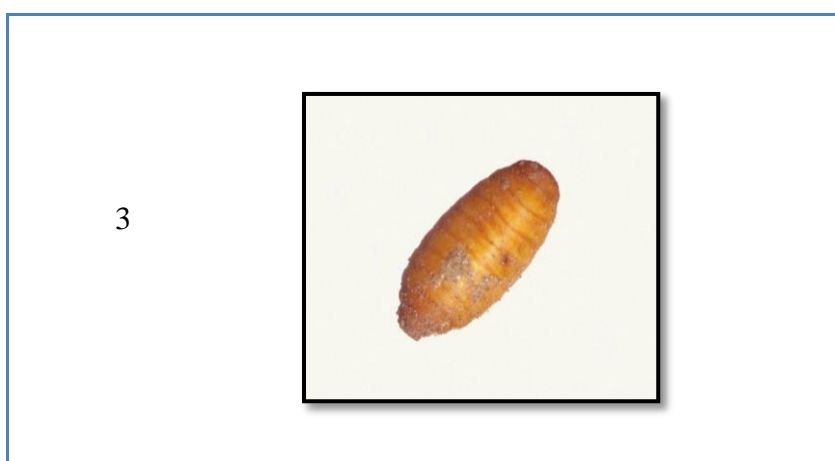


Figura 17 Resultados en el testigo

Tras los resultados obtenidos, donde la cepa de *M. anisopliae* no presentó visualmente la efectividad esperada, se realizaron análisis de covarianza para determinar si el número de pupas vivas iniciales tuvo un efecto significativo sobre: el número de pupas infectadas finales, número de pupas vivas finales y el número de pupas eclosionadas finales.

En la tabla 3 se observa el análisis de covarianza para el número de pupas infectadas finales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*, donde el número de pupas vivas iniciales no tuvo un efecto significativo sobre el número de pupas infectadas finales ($p= 0,1006$).

Tabla 3
ANCOVA para el número de pupas infectadas finales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	p-valor	Coef.
Modelo	4	0,26	0,06	1,77	0,1595	
Tratamiento	3	0,07	0,02	0,62	0,6061	
Pupas vivas iniciales	1	0,10	0,10	2,86	0,1006	0,09
Error	31	1,12	0,04			
Total	35	1,37				

Transformación: raíz $X + 1$ donde x = número pupas vivas iniciales y número pupas infectadas finales

C.V. = 17,23

En la figura 18 se observa que a los 28 días de la aplicación de *M. anisopliae* en el campo, el tratamiento 3 (1×10^8 UFC), presentó la mayor infección en las pupas, por

parte de *Rhizoctonia* sp., *Beauveria* sp. y *Fusarium* sp., demostrando la baja efectividad de la cepa *M. anisopliae*, en este tratamiento.

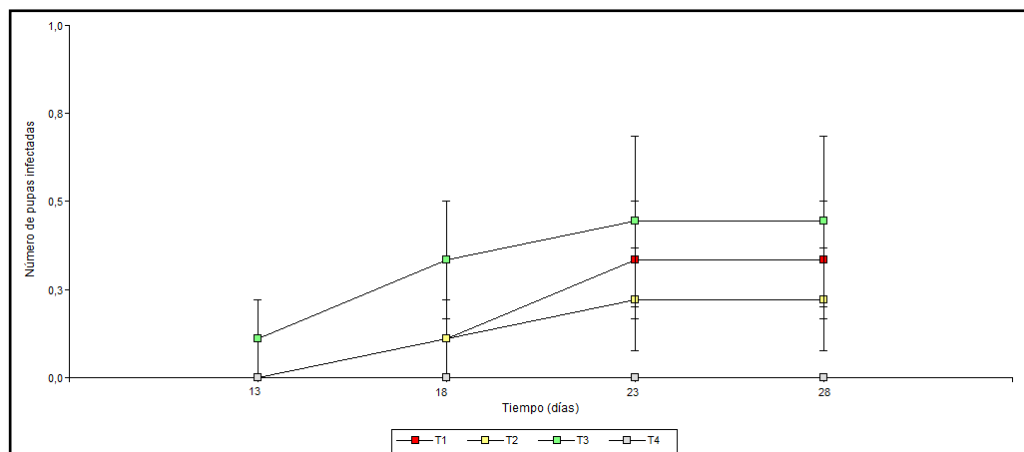


Figura 18 Número de pupas infectadas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días

En la tabla 4 se observa el análisis de covarianza para el número de pupas eclosionadas finales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*, donde el número de pupas vivas iniciales no tuvo un efecto significativo sobre el número de pupas eclosionadas iniciales ($p=0,1861$).

Tabla 4

ANCOVA para el número de pupas eclosionadas iniciales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	p-valor	Coef.
Modelo	4	0,82	0,21	0,93	0,4616	
Tratamiento	3	0,36	0,12	0,54	0,6561	
Pupas vivas iniciales	1	0,41	0,41	1,83	0,1861	0,18
Error	31	6,90	0,22			
Total	35	7,72				

Transformación: raíz $X + 1$ donde x = número pupas vivas iniciales y número de pupas eclosionadas iniciales

C.V. = 32,41

En la figura 19 se observa que a los 28 días de la aplicación de *M. anisopliae* en el campo, el número de pupas eclosionadas aumentaron progresivamente en los tratamientos 2 (1×10^7 UFC) y 3 (1×10^8 UFC), mientras que en el tratamiento 1 (1×10^6 UFC) no se registró diferencias en el número de pupas.

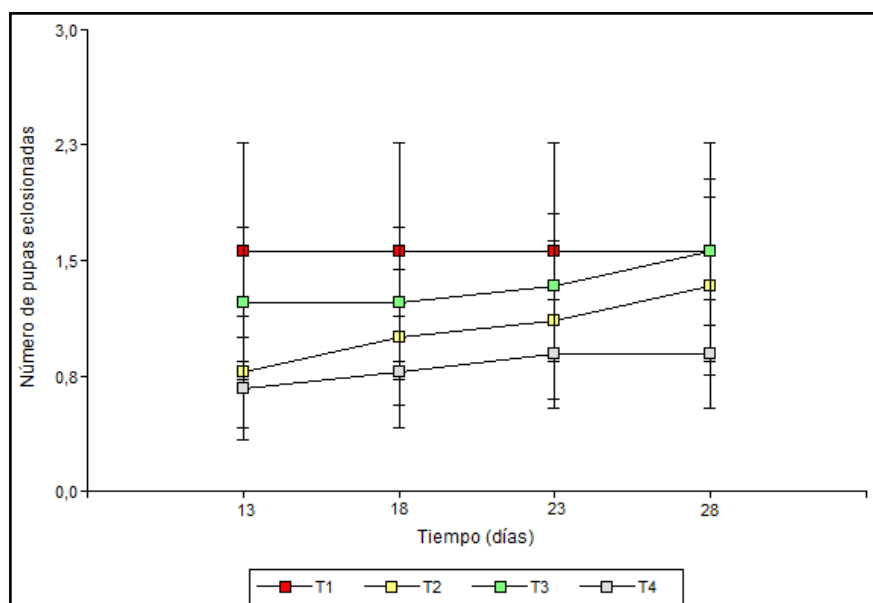


Figura 19 Número de pupas eclosionadas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días

En la tabla 5 se observa el análisis de covarianza para el número de pupas vivas finales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*, donde el número de pupas vivas iniciales obtuvo un efecto significativo sobre el número de pupas vivas finales ($p= 0,0065$).

Tabla 5

ANCOVA para el número de pupas vivas finales bajo el efecto de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae*

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	p-valor	Coef.
Modelo	4	0,57	0,14	2,80	0,0431	
Tratamiento	3	0,05	0,02	0,30	0,8261	
Pupas vivas iniciales	1	0,43	0,43	8,53	0,0065	0,19
Error	31	1,57	0,05			
Total	35	2,14				

Transformación: raíz $X + 1$ donde x = número pupas vivas iniciales y número de pupas vivas finales

C.V. = 19,52

En la figura 20 se observa que a los 28 días de la aplicación de *M. anisopliae* en el campo, el número de pupas sanas finales disminuyó progresivamente en los 3 tratamientos, mientras que en el testigo no se registró variación en el número de pupas sanas porque no se presentó infección.

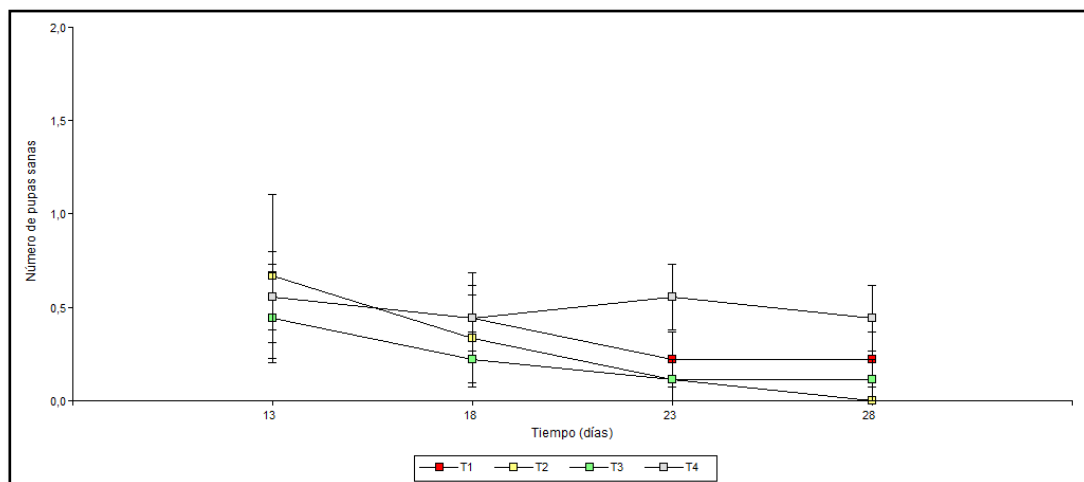


Figura 20 Número de pupas sanas en los diferentes tratamientos a los 13, 18, 23 y 28 días

4.3 Evaluación cualitativa de los dos tipos de medio de cultivo PDA y Sabouraud en el aislamiento de *Metharizium anisopliae*

En la figura 21 se observa el desarrollo de *Metharizium anisopliae* en los medios PDA Y Sabouraud. A los 5 días en el medio Sabouraud (a) se presentó el desarrollo de esporas, en mayor cantidad que el medio PDA (b). A los 10 días se observó un notable desarrollo de las esporas en ambos medios (c) y (d). A los 15 días el crecimiento en Sabouraud fue exuberante y visualmente presentó una buena esporulación (e), respecto al medio PDA donde se presentó una menor esporulación en comparación con el medio Sabouraud (f).

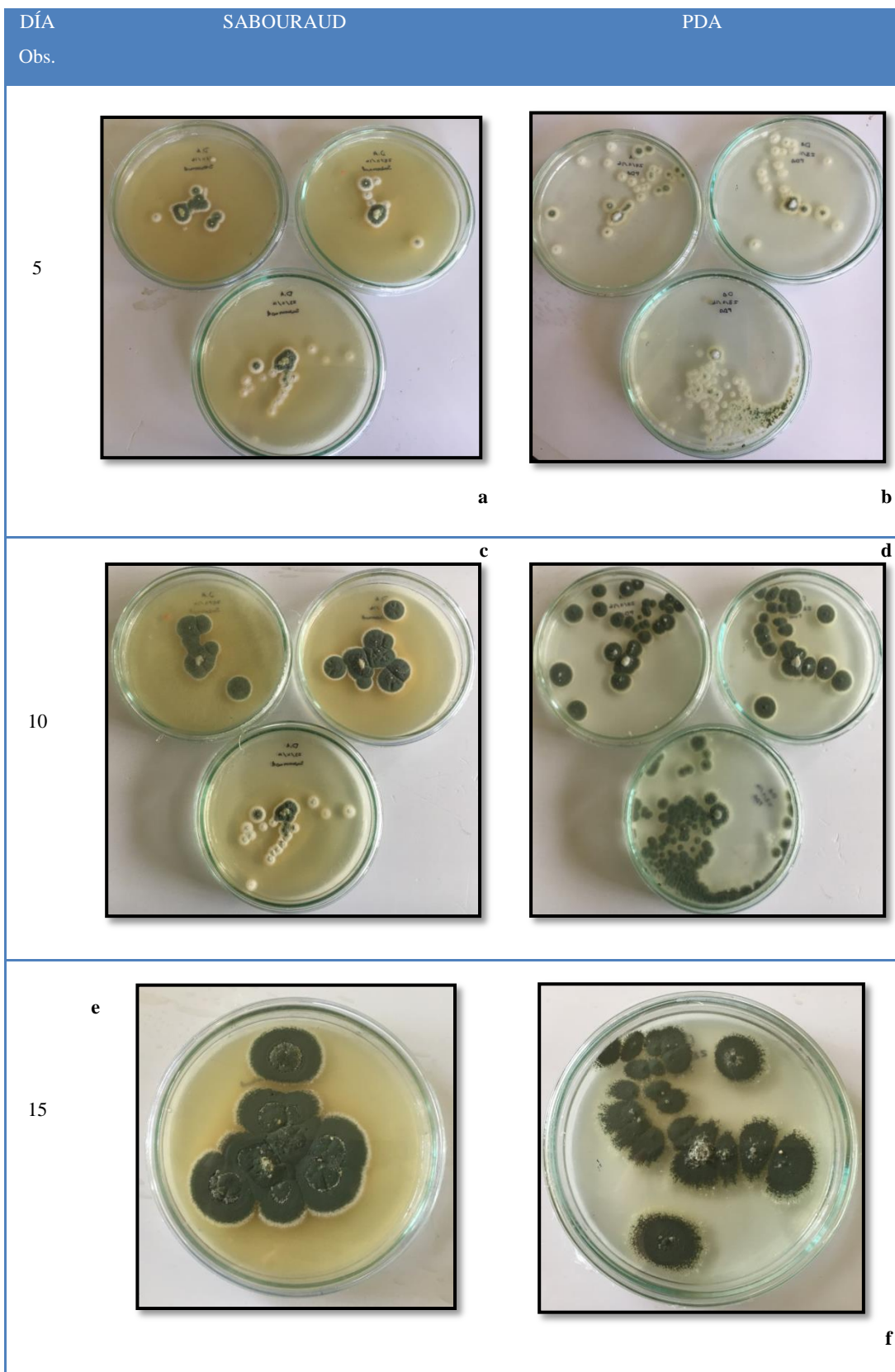


Figura 21 Crecimiento de *Metharizium anisopliae* en los dos medios de cultivo PDA y Sabouraud a los 5, 10 y 15 días del aislamiento en caja Petri

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Antes del montaje del ensayo, se realizó un muestreo exploratorio; con la finalidad de determinar la distribución de las pupas en el suelo. Sin embargo al realizar la evaluación inicial y una vez tabulados los datos, se pudo observar que el número de pupas no fue representativo, principalmente porque las muestras motivo de análisis (las pupas), se encontraban bajo el suelo y, a pesar de realizar un muestreo dirigido bajo cada fruto caído, no se pudo obtener pupas en un número representativo; al respecto GEIGY (1981), manifiesta que cuando se realiza un muestreo al azar, una de las condiciones de este método para obtener conclusiones valederas de la población total, depende del número representativo de muestras; en nuestro caso, se tomó una por cada tratamiento y por cada fecha de muestreo; cuyo número no resultó ser representativo.

Con respecto a la eficacia de *Metharizium anisopliae*, Gómez (1999) afirma que en ensayos de laboratorio para el control de la mosca de la fruta *Ceratitits capitata* (Wied.) se encontró que en larvas de III estadio próximas a empupar *M. anisopliae* produjo una mortalidad del 96,7% a una concentración de $1,8 \times 10^6$ conidias/ ml. Según Olalquiaga y Cortés (1952) citados por Rodríguez *et al.* (2004) señalan que en condiciones de campo, *Metarhizium anisopliae* puede producir mortalidad de hasta un 50% de la población de larvas de *Hylamorpha elegans* (gusano blanco presente en los cereales). En un estudio realizado para el control de broca del café en frutos del suelo, Jaramillo *et al.* (2015), menciona que se obtuvo máximo control con la mezcla Cenicafé (cepas de *B. bassiana*: Bb9001, Bb9024, Bb9119) más *M. anisopliae* (cepa Ma9236) a una concentración de 1×10^9 , con porcentajes de broca inferiores al 6,6%, disminuyendo la población en los frutos infestados en un 40%. En la presente investigación el porcentaje de efectividad en campo fue de 20% a una concentración de 1×10^6 , porque solo una de las cinco pupas del primer tratamiento, presentó infección de *M. anisopliae*.

Gómez (1999), afirma que, cuando se aplica *Metharizium anisopliae* en una zona donde no ha sido aislado del insecto objetivo del control, es necesario aplicar concentraciones muy altas para que se establezca en el suelo y comience su actividad

patogénica, es decir aplicar concentraciones mayores a 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 , las mismas que fueron empleadas en este estudio. Cabe recalcar que la cepa de *M. anisopliae* aplicada fue obtenida del salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*), en la localidad de Palo Quemado, vía Santo Domingo, la cual según Cañadas (1983), es una región muy húmeda sub-tropical cuya temperatura media anual oscila entre 18 y 22,8 °C, recibiendo una precipitación promedio anual entre 2000 y 3000 milímetros. Esta cepa fue aplicada en Guayllabamba que, según Cañadas (1983), es una región seca temperada que registra una temperatura media anual entre 12 y 18 °C, y una precipitación superior a los 200 pero inferior a los 500 milímetros. Como se puede observar tanto Palo Quemado como Guayllabamba, presentan características bioclimáticas completamente diferentes, que influyeron en el establecimiento y desarrollo del hongo en el sitio del ensayo y, por tanto en los resultados.

Con respecto a la aplicación de los dos tipos de medio de cultivo, PDA y Sabouraud en el aislamiento de *Metharizium anisopliae*, Maldonado (2013) menciona que Sabouraud es el medio de cultivo más utilizado en micología, parcialmente selectivo para hongos debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa, por su composición en este medio los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Corroborando con los resultados obtenidos en esta investigación, Sabouraud fue el medio de cultivo que presentó la mayor esporulación de *M. anisopliae* con respecto al medio PDA.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- La población inicial de pupas de *A. fraterculus* en la capa de suelo analizada, no resultó representativa debido a que las mismas se encuentran bajo la superficie del suelo, lo que dificulta analizar efectivamente la población presente en el sitio del ensayo.
- La aplicación de la cepa de *Metharizium anisopliae* en el sitio del ensayo no fue efectiva, alcanzando apenas un 20% de control. Esto muy probablemente se debe a que la cepa fue obtenida en una zona con condiciones climáticas diferente al sitio del ensayo.
- Al momento de realizar una investigación, las condiciones ambientales juegan un papel muy importante ya que pueden favorecer o dificultar el proceso y los resultados de la investigación.
- El medio de cultivo Sabouraud cualitativamente es el más idóneo para el aislamiento de *Metharizium anisopliae*, por el exuberante desarrollo que presentan las esporas en el mismo.

6.2 Recomendaciones

- Se debe realizar una evaluación más minuciosa para determinar si la población de la plaga, en nuestro caso pupas de *A. fraterculus*, es representativa para poder realizar el montaje del ensayo.
- En una investigación de este tipo, el entomopatógeno a evaluar, se debe obtener de la misma zona o de otra que presente condiciones bioclimáticas similares al sitio donde será realizado el estudio.
- Para realizar un ensayo en campo, se debe delimitar correctamente las parcelas donde serán aplicados los tratamientos, para asegurar que factores externos a cada unidad experimental, no interfieran en los resultados finales.
- En el aislamiento de *Metharizium anisopliae* se recomienda utilizar el medio de cultivo Sabouraud para un mejor desarrollo del hongo.

6.3 Bibliografía

- Acumedia. (4 de Diciembre de 2015). Obtenido de Neogen Corporation:
http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia_PI/7149_SP_PI.pdf
- Alarcón, D. (Agosto de 2016). *Aspecto microscópico de Metarhizium anisopliae*. Sangolquí, Ecuador.
- Alarcón, D. (Diciembre de 2016). *Larvas de Anastrepha fraterculus en fruto de Feijoa*. Guayllabamba, Ecuador.
- Alarcón, D. (Enero de 2017). *Adulto de Anastrepha fraterculus emergiendo de la pupa*. Sangolquí, Ecuador.
- Alarcón, D. (Enero de 2017). *Pupa de Anastrepha fraterculus contaminada con Metarhizium anisopliae*. Sangolquí, Ecuador.
- Arce, M. (2009). Norma climática y distribución de la precipitación de la Hacienda El Prado-IASA. *Serie Zoológica* 8 (4-5), 126-128.
- Arias López, P., Banda Banda, B., Bejarano de la Cruz, R., Benites Salcedo, D., & Arellano Barragán, J. (2014). Efecto de Beauveria bassiana sobre la mosca Anastrepha sp. y larvas del cogollero Spodoptera frugiperda en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST, Revista Científica de Estudiantes Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Perú*.
- Boscán, N. (1992). Manejo Integrado de las Moscas de las Frutas. *FONAIAP DIVULGA*.
- Cañadas, L. (1983). *El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador*. Quito.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. Perú.
- Carballo, M., & Guaharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas. *Serie técnica Manual Técnico N° 53*.

- Castellanos, L., Muiño, B., Lorenzo, M., Rodríguez, A., & Gómez, M. (2011). Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. *Fitosanidad*.
- Castillo, S. (2006). Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo. 17.
- Databio. (2012). *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. Obtenido de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf>
- FAO, O. d. (2006). *Agronomía de los Cultivos Andinos*. Recuperado el 2016, de <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s04.pdf>
- Fernandes, E., Keyser, C., & Rangel, D. (2010). CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological Control*.
- Fischbein, D. (2012). Introducción a la teoría del control biológico de plagas. En J. Villacide, & J. Corley, *Manejo Integrado de Plagas Forestales*. Bariloche: INTA.
- Fuentes, C. (2007). LOS POSTULADOS DE KOCH: REVISIÓN HISTÓRICA Y PERSPECTIVA ACTUAL. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 263-266.
- Ganchozo, E. (2015). Obtenido de Repositorio Digital UTEQ: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1269/6/T-UTEQ-0017.pdf>
- García, N. (2012). Obtenido de “PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmósferas oxidantes: <http://148.206.53.84/tesiuami/210389335.pdf>
- GEIGY, C. (1981). *Manual para ensayos de campo en protección vegetal*. Basilea.

- Gómez, H. (1999). Experiencias en la utilización del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en el control de plagas agrícolas en el Perú. *Revista peruana de Entomología*, 79-82.
- Gómez, P., & Mendoza, J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. *Centro de investigaciones de la caña de azúcar del Ecuador-CINCAE*.
- González-Castillo, M., Aguilar, C., & Rodríguez-Herrera, R. (Diciembre de 2012). *Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas*. Obtenido de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%208/5.html>
- Hernández-Ortiz, V., & Morales-Valles, P. (2004). Distribución geográfica y plantas hospederas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) en Venezuela. *Folia Entomológica mexicana*, 182-189.
- Hernández-Ortiz, V., Guillén-Aguilar, J., & López, L. (2010). Taxonomía e Identificación de Moscas de la Fruta de Importancia Económica en América. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, 49-80.
- Hidalgo, D. (27 de Mayo de 2016). Metodología para el aislamiento de hongos entomopatógenos. (D. Alarcón, Entrevistador)
- Jaramillo, J., Montoya, E., Benavides, P., & Góngora, c. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 41, 96-104.
- Lecuona, R., & Kruger, R. (5 de Septiembre de 2014). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Recuperado el 20 de Mayo de 2016, de <http://inta.gob.ar/noticias/hongos-beneficos-para-combatir-a-las-plagas-de-arroz>
- Lezama, R., Molina, J., & López, M. (2004). Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control de gusano cogollero en el campo. *AVANCES EN INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA*, 1-5.

- Lozano, M. (2015). Los hongos entomopatógenos y sus en el control de tefrítidos (Diptera: Tephritidae) y su efecto contra hongos de suelo patógenos de Olivo. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba*.
- Macas, G. (2014). Ecuador aumenta sus exportaciones de fruta al mundo. *El Agro*. Recuperado el 17 de Mayo de 2016, de <http://www.revistaelagro.com/2014/04/28/ecuador-aumenta-sus-exportaciones-de-frutas-al-mundo/>
- Maldonado, V. (2013). *Eficiencia del medio de cultivo Sabouraud, modificado con almidón de yuca y tetraciclina para el aislamiento de Dermatofitos*. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/3996>
- Maps, G. (2017). Obtenido de <https://www.google.es/maps/place/Guayllabamba,+Quito,+Ecuador/@-0.0672515,-78.3855094,9429m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x91d58b98c3ea3447:0xe54daac17b11df43!8m2!3d-0.0639882!4d-78.3500875>
- Maps, G. (2017). Obtenido de <https://www.google.es/maps/place/IASA/@-0.3856423,-78.4185909,589m/data=!3m2!1e3!4b1!4m5!3m4!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3856423!4d-78.4164022>
- Matheus, H. (2005). *Las moscas de la fruta*. Bogotá: Grupo Transferencia de Tecnología.
- Mora, F. (1996). COMBATE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* MEDIANTE EL EMPLEO DE *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* EN EL CAMPO. *AGRONOMIA MESOAMERICANA* , 23-30.
- Motta-Delgado, P., & Murcia- Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y Agua*, 77-90.
- Motta-Delgado, P., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y Agua*, 77-90.

- Nakano, O., Silveira, S., & Zucchi, R. (1981). *Entomología económica*. Piracicaba: Livroceres Ltda.
- Paucar, C. (2015). *Monitoreo e identificación de especies de moscas de la fruta, en cultivos hortofrutícolas del cantón Espíndola*. Loja.
- Pérez Kepp, O. (2013). 13870 - Control Microbiano de Insectos: Hongos Entomopatógenos afectando insectos “plaga” en el cultivo maíz . *Cadernos de Agroecología – ISSN 2236-7934 – Vol 8*.
- Rodríguez, M., France, A., & Gerding, M. (2004). EVALUACIÓN DE DOS CEPAS DEL HONGO *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) PARA EL CONTROL DE LARVAS DE GUSANO BLANCO *Hylamorpha elegans* Burm.(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE). *Agricultura Técnica*.
- Schapoaloff, M., Angeli, L., Urrutia, M., & López, C. (2015). Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Elsevier Revista Argentina de Microbiología*, 138-142.
- Tigrero, J. (2009). Hospederos de moscas de la fruta en Ecuador. *Boletín Técnico 8, Serie Zoológica 4-5: 107-116* , 107-116.
- Tigrero, J. (27 de Mayo de 2016). Métodos para el conteo de pupas . (D. Alarcón, Entrevistador)
- Valdez, M. (2011). *Terapias Alternativas*. Recuperado el 5 de Julio de 2016, de <http://recuperalasalud.blogspot.com/2015/06/beneficios-para-la-salud-de-feijoa.html>
- Valenzuela, G. (2012). Mosca de la fruta limita potencial exportador. *El Agro*.
- Vela, P., Salinero, C., Piñón, P., & Sainz, M. (2009). Características del fruto de *Acca sellowiana* cultivada en Galicia.
- Vilatuña, J., Sandoval, D., & Tigrero, J. (2010). *Manejo y control de moscas de la fruta*. Quito. Obtenido de MOSCAS DE LA FRUTA EN ECUADOR Y ACCIONES DE

AGROCALIDAD:<https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1437-26.pdf>

Wong, S. (Junio de 2008). Banano con estándares propios. *América Economía*.

Zucchi, R., Araujo, E., Canal D, N., & Uchoa F, M. (s.f.). Obtenido de LA MOSCA SUDAMERICANA DE LAS FRUTAS, *Anastrepha fraterculus*: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/30/007/30007838.pdf