



Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas

Maldonado Guamán, Jhonny Agustín

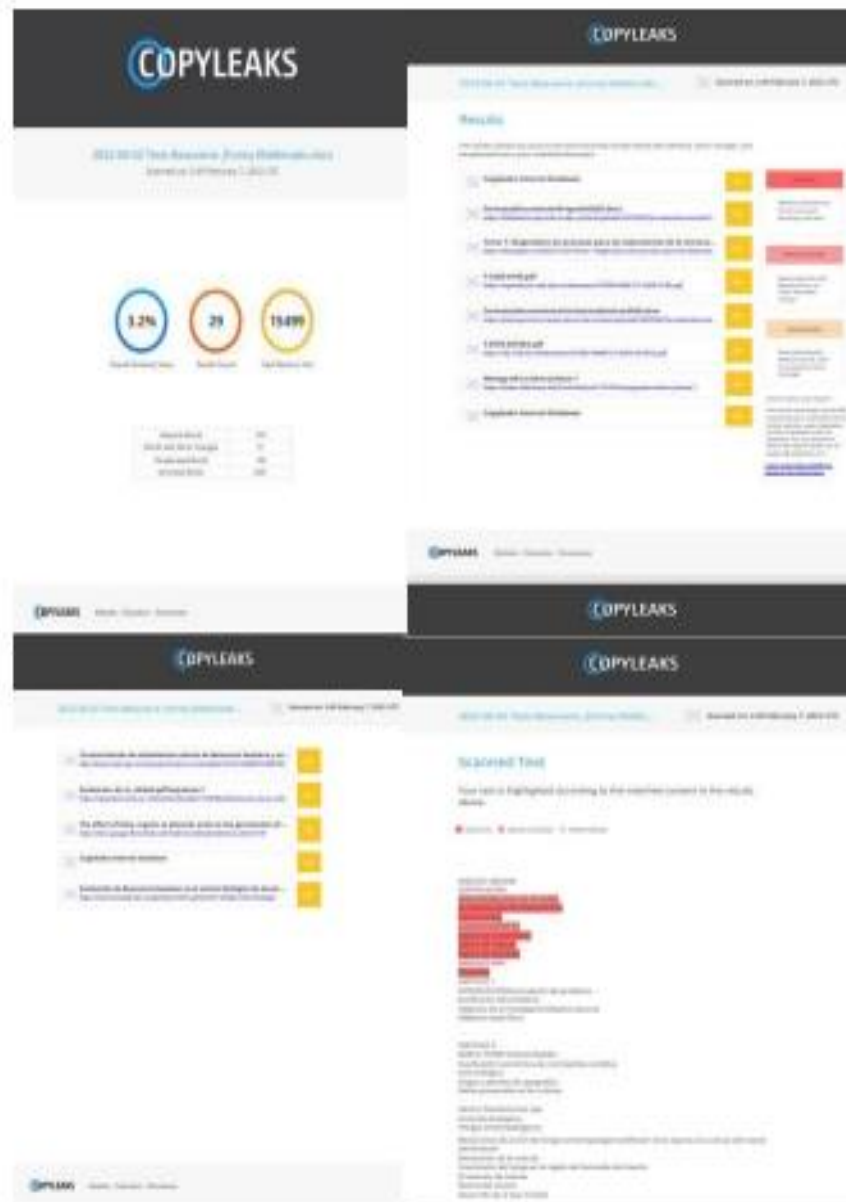
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Reyna Bello, Armando Ph.D.

02 de marzo del 2022



Firmado digitalmente por
 ARMANDO REYNA BELLO
 Nombre de reconocimiento (DN):
 c=EC, o=SECURITY DATA S.A. S, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION
 DE INFORMACION,
 serialNumber=296620182234,
 cn=ARMANDO REYNA BELLO
 Fecha: 2022.03.02 13:07:26 -0500

Reyna Bello, Armando PhD
 C.C.: 1758891830
 Director de proyecto de investigación



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, "Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas" fue realizado por el señor **Maldonado Guamán Jhonny Agustín** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN): o=EC,
ou=SECURITY DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD
DE CERTIFICACION DE INFORMACION,
serialNumber=290620182334,
cn=ARMANDO REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.02 13:07:42 -05'00'

Reyna Bello, Armando Ph.D
Docente investigador ESPE.ES
C.C.: 1758891830



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo **Maldonado Guamán Jhonny Agustín** con cedula de ciudadanía n° 2350293912, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular **“Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Maldonado Guamán, Jhonny Agustín
C.C: 2350293912



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Maldonado Guamán Jhonny Agustín** con cedula de ciudadanía n° **2350293912** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular **“Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo del 2022

Maldonado Guamán, Jhonny Agustín
C.C: 2350293912

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación a Dios por verme permitido concluirlo en todas sus etapas de desarrollo y durante toda la carrera por sus bendiciones recibidas, a mis padres Agustín Maldonado, Lida Guamán y toda mi familia por verme apoyado en los momentos más difíciles que permitieron mi formación como profesional.

Agradecimientos

Quiero dar un total agradecimiento a Saul Lema Asqui PhD. docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe sede Santo Domingo de la carrera de Ingeniería en Biotecnología quien, me supo guiar con sus conocimientos en este corto periodo de tiempo durante sus clases y un apoyo total en el desarrollo de la metodología de la presente investigación.

A mi profesor Eduardo Argotti PhD por todas sus enseñanzas impartidas durante toda la carrera, quien además me brindo su apoyo.

A la laboratorista Ing. Katty Medina por su colaboración dentro del laboratorio de microbiología donde se desarrolló la parte experimental de la investigación.

A mi tutor Armando Reyna PhD por toda la confianza prestada para el desarrollo de la parte de biología molecular en las áreas del laboratorio.

A mi profesora Anabell del Roció Urbina PhD por todas sus enseñanzas impartidas y totalmente agradecido por su apoyo en mis momentos difíciles.

A mis amigos de la universidad Mateo, Brandon, Harrison, Jordán y Jefferson por los buenos recuerdos vividos durante toda la carrera.

Índice de contenido

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido.....	8
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	12
Abreviaturas	13
Resumen.....	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema.....	17
Objetivos de la investigación	18
Objetivo General	18
Objetivos específicos.....	18
Capitulo II: Marco teórico.....	19
Clasificación taxonómica de <i>cosmopolites sordidus</i>	19
Ciclo biológico	21
Nota: Recuperado de (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).....	22
Origen y distribución geográfica	22
Daños provocados en los cultivos	22
Genero <i>Pseudomonas</i> spp.	23
Controles biológicos.....	24
Hongos entomopatógenos.....	25
Mecanismos de acción de hongos entomopatógenos	26
Adhesión de la espora a la cutícula del insecto.....	26
Germinación	27
Penetración de la cutícula	27
Crecimiento del hongo en la región del hemocele del insecto	28
Producción de toxinas	28
Muerte del insecto	29
Desarrollo de la fase micelial	29
Emergencia del micelio al exterior de la cutícula.....	29
Producción y dispersión de unidades infectivas	29

Mecanismos de defensa de los insectos para la evasión de la infestación de hongos entomopatógenos	29
Genero <i>Beauveria</i>	30
Características macroscópicas	31
Características microscópicas	31
Metabolitos secundarios del género <i>Beauveria spp.</i>	32
Hipótesis	35
Capítulo III: Materiales y métodos	36
Material biológico	36
Fase de Campo.....	36
Recolección de muestras de suelo y especímenes de <i>Cosmopolites sordidus</i> .36	
Recolección de frutos de café con manifestaciones fúngicas.....	38
Fase de laboratorio	39
Método de aislamiento de hongos entomopatógenos.....	39
Métodos directos	39
Dilución seriada	40
Siembra y aislamiento de productos comerciales	40
Métodos de purificación de hongos	40
Obtención de cultivo monospórico.....	41
Caracterización macroscópica de los aislamientos.....	41
Caracterización microscópica de los aislamientos	42
Caracterización morfológica de <i>Cosmopolites sordidus</i>	42
Establecimiento de los insectos bajo condiciones de laboratorio	42
Extracción de ADN	43
Reacción en cadena de la polimerasa para regiones ITS1, ITS4.....	44
Secuenciación de las amplificaciones de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer)	46
Patogenicidad de los aislados de <i>Beauveria bassiana</i>	46
Extracción de metabolitos de <i>Beauveria Bassiana</i>	47
Conservación del material biológico	47
Diseño estadístico.....	49
Patogenicidad de los aislados de <i>Beauveria</i>	49
Extractos metanólicos de <i>Beauveria Bassiana</i>	49
Capítulo IV: Resultados y discusión	50
Aislamiento de <i>Beauveria spp</i> de productos comerciales.....	50
Aislamiento de <i>Beauveria spp.</i> de <i>Hypothenemus hampei</i>	51
Purificación del aislamiento de <i>Beauveria spp</i> de <i>Hypothenemus hampei</i>	52
Cultivos monospóricos de los aislados de <i>Beauveria spp.</i>	53
Extracción de ADN.....	54
Amplificación de regiones ITS	55

Secuenciación	55
Árbol filogenético.....	58
Caracterización morfológica de <i>Cosmopolites sordidus</i>	59
Bioensayos.....	60
Efectos antibacterianos de los aislados de <i>Beauveria Bassiana</i> en el género <i>Pseudomonas spp.</i>	62
Efectos antibacterianos de extractos crudos de <i>Beauveria Bassiana</i> en el género <i>Pseudomonas spp.</i>	64
Efectos antibacterianos de extractos crudos de <i>Beauveria Bassiana</i> en el género <i>Pseudomonas spp.</i>	66
Capítulo V: Conclusiones	69
Capítulo VI: Recomendaciones	71
Capítulo VII: Bibliografía	72

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Cosmopolites sordidus</i>	20
Tabla 2 Clasificación taxonómica del género <i>Pseudomonas</i> spp	24
Tabla 3 Especificaciones de las concentraciones de los reactivos del Máster Mix... 45	45
Tabla 4 Condiciones de reacción de amplificación de regiones ITS..... 45	45
Tabla 5 Detalles del porcentaje de identidad y numero de acción en el Genbank de secuencias homologas. 56	56
Tabla 6. Descripción del número total de insectos muertos del género <i>Cosmopolites Sordidus</i> a una concentración de 10^6 esp/mL de <i>Beauveria Bassiana</i> en un periodo de tiempo de 72 horas. 61	61
Tabla 7 Diámetros del halo de inhibición de los diferentes aislados de <i>Beauveria Bassiana</i> con tres repeticiones por cada tratamiento. 64	64
Tabla 8 Resultados estadístico descriptivo de Chi-Cuadrado 66	66
Tabla 9 Prueba de normalidad Shapiro-Wilk 66	66
Tabla 10 Análisis de varianza para Halo de inhibición por <i>Beauveria bassiana</i> 67	67
Tabla 11 Pruebas de múltiples rangos para Halo de inhibición por <i>Beauveria bassiana</i> 67	67

Índice de figuras

Figura 1 Cosmopolites Sordidus, macho adulto a una escala de un milímetro	20
Figura 2 Ciclo biológico de Cosmopolites sordidus	22
Figura 3 Aspecto morfológico de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de <i>Pseudomonas syringae</i> en medios de cultivos semi-selectivo MSP modificado.	24
Figura 4 Proceso de infestación de hongos entomopatógenos en insectos huésped	26
Figura 5 Estructura química de la Oosporeína.....	33
Figura 6 Estructura química de Tenellin	33
Figura 7 Estructura química de Bassianin	34
Figura 8 Estructura química de Beauvericina.....	35
Figura 9 Ubicación de la toma de muestras de suelo y especímenes de <i>Cosmopolite Sordidus</i>	37
Figura 10 Zona de recolección de frutos de café con evidencia fúngica a nivel macroscópico.....	38
Figura 11 Características macroscópicas de Beauveria bassania	53
Figura 12 Extracción de ADN genómico por el método de CTAB	54
Figura 13 Amplicones de las regiones ITS de los aislados de Beauveria bassiana .	55
Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias moleculares de los aislamientos frente a distintas secuencias ITS del género Beauveria spp.....	57
Figura 15 Árbol filogenético de las secuencias moleculares de los distintos aislados de Beauveria bassiana	58
Figura 16 Micosis en insectos del género Cosmopolite sordidus.....	62

Abreviaturas

μM : Micromolar

μL : Microlitros

U: Unidades

MgCl_2 : Cloruro de magnesio

dNTP: Desoxinucleotidos

mM: Milimolar

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ng: Nanogramos

μL : Microlitro

pb: Pares de base

cm: Centímetros

esp/ml: Esporas/mililitro

GI: Grados de libertad

Total (Corr): Total Corregido

Resumen

Los cultivos agrícolas del género *Musa* representa el quinto cultivo de mayor importancia a nivel mundial. Se encuentran expuestos a insectos plagas como *Cosmopolites sordidus* y bacterias fitopatógenas del género *Pseudomonas spp* por lo que su producción en rendimiento por hectárea cultivada puede ser disminuida hasta en un 60%. Siendo el objetivo de este presente estudio de investigación “Caracterizar hongos entomopatógenos del género *Beauveria spp* con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas” mediante características morfológica y moleculares. Los aislamientos de *Beauveria bassiana* se realizaron de productos comerciales disponibles a nivel país-Ecuador y de aislamientos de frutos de *Coffea canephora* que se obtuvieron en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. La capacidad patogénica frente a *Cosmopolites sordidus* y *Pseudomonas spp* se evaluaron por medio de bioensayos y antibiogramas, empleándose diseño estadístico descriptivo de Chi-Cuadrado y análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Se logro determinar que la patogenicidad de los distintos aislados de *Beauveria bassiana* es independiente del tiempo de inoculación en *Cosmopolites sordidus*, y una actividad antibacteriana sobre el género *Pseudomonas spp* presentándose distancias filogenéticas distintas en el aislamiento C3-100 JM dentro del grupo de aislamientos en el que se determinó un mejor control biológico.

Palabras claves

- **BEAUVERIA BASSIANA**
- **ITS**
- **PCR**
- **SECUENCIACIÓN**

Abstract

Agricultural crops of the *Musa* genus represent the fifth most important crop worldwide. They are exposed to insect pests such as *Cosmopolites sordidus* and phytopathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas spp* so that their yield production per cultivated hectare can be reduced by up to 60%. The objective of this research study was "To characterize entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria spp* with potential for biological control of biotic stress in plants" by means of morphological and molecular characteristics. Isolations of *Beauveria bassiana* were made from commercial products available in Ecuador and from isolates of *Coffea canephora* fruits obtained in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas. The pathogenic capacity against *Cosmopolites sordidus* and *Pseudomonas spp.* was evaluated by means of bioassays and antibiograms, using descriptive statistical design of Chi-Square and analysis of variance (ANOVA) of one factor. It was determined that the pathogenicity of the different isolates of *Beauveria bassiana* is independent of the inoculation time in *Cosmopolites sordidus*, and an antibacterial activity on the genus *Pseudomonas spp.*, presenting different phylogenetic distances in the isolate C3-100 JM within the group of isolates in which a better biological control was determined.

key words

- **BEAUVERIA BASSIANA**
- **ITS**
- **PCR**
- **SEQUENCING**

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

Los cultivos de agrícolas del género *Musa* están expuestos a diversas enfermedades fitopatológicas causantes de limitar su producción, tanto en pequeñas, medianas o grandes explotaciones. Entre los agentes patógenos encontramos virus, insectos, bacterias u hongos tales como: *Mycosphaerella eumusae*, *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, *Ralstonia Solanacearum*, *Xanthomonas campestris pv. Musareum*, virus del estriado del plátano (BSV), virus del mosaico de la bractea (BBrMV) y virus del bunchy top (BTV) (Gilberto Manzo-Sánchez, 2014).

Existen alrededor de 470 especies de ácaros e insectos que se han registrado como plagas; 250 de ellos su alimentación se basa en el follaje causando daños en el área fotosintética, reduciendo significativamente los fotosintatos que son trasladados al rizoma, provocando mayores afectación las siguientes especies *Ceramidia butleri*, *Ceramidia viridis*, *Antichloris eriphia*; 70 se alimentan del rizoma y raíces, como *Cosmopolites Sordidus* que se encuentra en casi todas las áreas productoras de banano ocasionando la muerte en plantas jóvenes y susceptibilidad al daño por vientos en plantas maduras ; 10 barrenan el pseudotallo, siendo esta la parte menos afectada de la planta, donde sus daños son provocados cerca de la línea del suelo ingresando generalmente por cortes o perforaciones; 130 dañan flores y frutos como *Dacus musae*, *Opogona subcervinella*, *Tiracola plagiata* y *Plusia chalcytes*, los cuales provocan una disminución en la calidad de la fruta debido a manchas ocasionadas al ovipositar y alimentarse; 10 o más son vectores de enfermedades, catalogando especies como *Pentaionia nigronervosa* causante de transmitir enfermedades virales (Ostmark, 1974).

Cosmopolite Sordidus ocasiona una reducción hasta en un 60 % en el peso de los racimos equivaliendo a pérdidas económicas importantes en toneladas producidas anualmente, además de los daños colaterales por las perforaciones en el corno

permite el ingreso de otros microorganismos patógenos (bacterias) que afectan los haces vasculares; como *Ralstonia solanacearum* que es el agente causante de la enfermedad conocida como "Moko" (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).

Justificación del problema

Ecuador entre los años 2016-2018 fue el responsable del 36% de la exportación de banano a nivel mundial (FAO, 2019) con aproximadamente 6,5 millones de toneladas, que reflejaron un rubro de 3 mil millones de dólares, siendo así el segundo ingreso de mayor importancia en la economía ecuatoriana, después de los ingresos generados por las extracciones petroleras (CFN, 2017). Las mayores extensiones territoriales para el cultivo de banano se registra en las provincias de Los Ríos (32%), El Oro (25%) y el Guayas (21%), dando un total de aproximadamente de 178.461 hectáreas, mientras que la producción de plátano se localiza en las provincias de Manabí con un 40%, en Santo Domingo un 14% y Los Ríos un 7%, de un total de 19.379,26 hectáreas, sin tomar en cuenta los cultivos de otras musáceas como el abacá, orito y morado que se distribuyen en las provincias de Santo Domingo, Cañar, Bolívar, Chimborazo y Cotopaxi (MAG, 2020).

Los cultivos de plátano (*Musa AAB*) representa el quinto cultivo de mayor importancia a nivel mundial, después de la papa, maíz, trigo y arroz, siendo incorporado a la dieta básica alimenticia de las poblaciones en países tropicales que se encuentran en vías de desarrollo. Debido al alto uso de agroquímicos para el manejo fitosanitario en los cultivos de musáceas; se han incrementado de forma exponencial en los últimos años los impactos ambientales negativos, que afectan la calidad del aire, aguas superficiales, aguas subterráneas y suelo; por lo cual el uso de agentes biológicos o sus derivados metabólicos se presenta como una alternativa viable para una agricultura sustentable y amigable con el medio ambiente en las próximas décadas (Rina Mercedes Bucaram Leverone, 2016).

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Caracterizar hongos entomopatógenos del género *Beauveria* con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas.

Objetivos específicos

Aislar cepas del género *Beauveria* de formulados comerciales.

Caracterizar morfológicamente las cepas aisladas del género *Beauveria*.

Caracterizar molecularmente las cepas aisladas del género *Beauveria*.

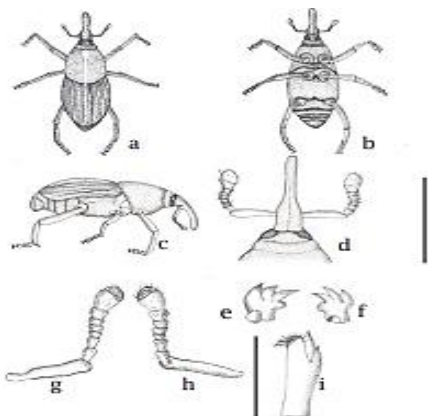
Capítulo II Marco teórico

Clasificación taxonómica de *cosmopolites sordidus*

Cosmopolites Sordidus (Coleoptera: Curculionidae) comúnmente conocido como picudo negro del plátano y banano, son categorizados como uno de los principales insectos plaga en los cultivos de *Musa* en el mundo (Dairys García-Perera, 2019). Identificado por primera vez por Germar en 1824 como *Calandra Sordida*, este insecto pertenece al género *Cosmopolites* de la familia Curculionidae, subfamilia Rhynchophorinae. Su movilidad es escasa por ello sus poblaciones presentan un flujo genético limitado (Clifford S. Gold, 2003). Tiene una coloración negra brillante con una superficie glabra, que está cubierta de abundantes poros pequeños localizados en la región dorsal del tórax y abdomen, con una cabeza pequeña y compacta comparada proporcionalmente con el resto del cuerpo (Figura 1); ojos oscuros y ovalados ocupando la mitad del ancho de la cabeza; con un pico largo, oscuro y curvo, que sobre su base presenta una inserción antenal amplia por encima de la línea media ocular, siendo del tipo clavadas-ocadadas de 9 segmentos; mandíbulas pequeñas y fuertemente esclerosadas de color oscuro con una forma simétrica subtriangular; la maxila presenta el estipete y el cardo fusionados, con unas patas anteriores largas y finas (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).

Figura 1

Cosmopolites Sordidus, macho adulto a una escala de un milímetro



Nota: a. vista dorsal; b. vista ventral; c. vista lateral; d. pico; e y f mandíbulas; g y h antenas; i. maxilar; recuperado de (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de *Cosmopolites sordidus*

Reino:	Animalia
Filo:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Coleoptera
Superfamilia:	Curculionoidae
Familia:	Curculionidae
Subfamilia:	Dryophthorinae
Tribu:	Sphenophorini
Genero:	<i>Cosmopolites</i>
Especie:	<i>Sordidus</i>

Nota: Recuperado de (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).

Ciclo biológico

Adulto: Es un insecto monófago que tiene la capacidad de desarrollar todo su ciclo biológico en los cultivos de musáceas, donde sus etapas o estadios están correlacionado de forma directamente proporcional a la temperatura y épocas de lluvias. En su estado adulto su actividad es nocturna con un fototropismo negativo; mientras que en las etapas inmaduras se localizan en el bulbo, con un estilo de vida críptico en la planta huésped, evitando de esta forma enemigos naturales, catalogando su supervivencia de tipo "K estratega" llegando a vivir hasta cuatro años (Koppenhofer, 1993). Los adultos se pueden encontrar localizados principalmente en las vainas de las hojas o en la base de la estera en el suelo, se alimentan del tejido en descomposición o de los retoños jóvenes, llegando a sobrevivir a periodos prolongados entre dos a seis meses sin alimentación en ambientes húmedos (Moznette, 1920).

Ovoposición: Las hembras depositan sus huevos que poseen una dimensión de 0,5 x 2 mm² en pequeñas cavidades de 1-2 mm de profundidad, excavados con su tribuna o pico en el tejido vegetal del rizoma de los retoños y en el área de la corona de las plantas cosechadas, siendo estos cubiertos por el látex y el tejido necrótico. La amplia variación en este estadio tiene una duración entre seis a ocho días, documentando una tasa de eclosión que superan el 80% (Koppenhofer, 1993).

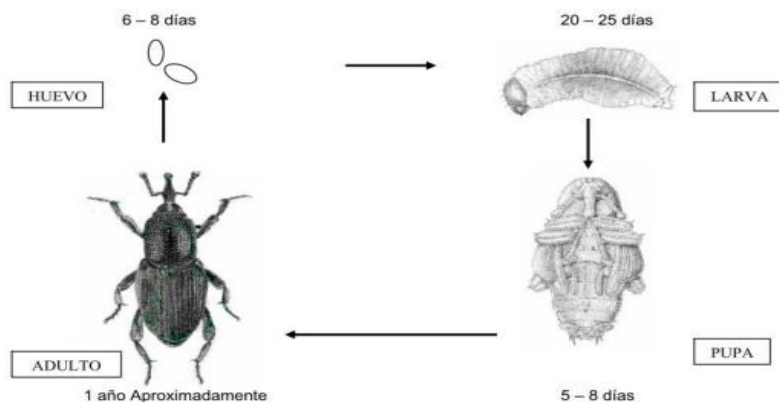
Larva: Esta etapa se manifiesta entre los 20 y 25 días, llegando a medir al menos 13mm, con una coloración blanca en su cuerpo y su cabeza rojiza bastante prominente, presenta seis pares de patas, con el ultimo par ubicado en la región del lóbulo alar; donde los segmentos dorsales se dividen en cuatro partes, prostscutellum, scutellum, scutum, praescutum (Moznette, 1920). Su alimentación se basa en el tejido del cormo provocando una reducción de absorción de nutrientes y el debilitamiento de la planta (Clifford S. Gold, 2003).

Pupa: La pupación se desarrolla en una cámara desnuda, que son excavadas por las larvas en las plantas hospedantes cerca del bulbo, esta etapa varía entre 5 a

23 días a una temperatura de 30 y 16 grados centígrados respectivamente, en las que se han observado una mortalidad entre el 10 y 19 % (Traore L, 1996).

Figura 2

Ciclo biológico de *Cosmopolites sordidus*



Nota: Recuperado de (Luís Fernando Vallejo-E, 2007).

Origen y distribución geográfica

Su punto de origen está ubicado en la región Indo-Malaya al sudeste asiático correlacionado con el punto de origen del banano, se han asignado más de 40 especies a *Dryophthorus* en Europa, América Central, Nueva Zelanda, Japón, Nueva Guinea, Java, América del Norte, Hawái y Nueva Caledonia; describiéndose un total de 17 especies en la fauna endémica de Hawái sin explicar porque los gorgojos cubren gran parte del territorio (Zimmerman, 1968).

Daños provocados en los cultivos

El daño provocado por *Cosmopolites Sordidus* se evidencia en la reducción del diámetro de circunferencia de la planta (cilindro central), la altura, tiempo de maduración y peso en los racimos, llegando a ocasionar pérdidas en el rendimiento hasta un 44% entre el primer y cuarto ciclo, siendo este un aumento creciente y constante de pérdidas de rendimiento en los cultivos (CS Gold, 2004).

Genero *Pseudomonas* spp.

Son bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados con flagelos polares; aerobios no fermentadores de glucosa, con la capacidad de formar esporas. Pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, phylum *Proteobacteria* y orden *Pseudomonadales*, sus hábitats naturales son el agua y el suelo. Donde la mayoría de especies de este género no crecen en condiciones de pH menores a 4.5, estableciendo subgrupos basados en características patogénicas y fenotípicas (Bram Slabbinck, 2009).

Estas bacterias fitopatógenas son causantes de manchas, canchros y tizón; con la capacidad de mantenerse asociadas como epifitas foliares en las plantas, debido a susceptibilidad de la superficie de las hojas (filosfera o el filoplano) al ser colonizados por hongos filamentosos, bacterias y levaduras ya que se encuentran expuestas a condiciones fluctuantes de temperatura, radiación y humedad, a pesar que estas se encuentran recubiertas por una capa de cera cuticular de naturaleza hidrófoba. La liberación de bio-surfactantes producido por bacterias del género *Pseudomonas spp* se encuentran relacionados con la capacidad de romper membranas celulares de las plantas lo cual les permite incrementar la disponibilidad de agua y nutrientes (Lillian Bunster, 1989).

Pseudomonas syringae (Figura 3) se subdivide en más de 60 patovares que han sido definidos por caracteres patogénicos con nuevo genomoespecies que se encuentran caracterizadas por hibridación ADN-ADN, además de trece filogrupos (filogenéticos) definidos por multilocus (David A Baltrus, 2017).

Figura3

Aspecto morfológico de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *Pseudomonas syringae* en medios de cultivos semi-selectivo MSP modificado.



Nota: Recuperado de (Marusia Stefanova, 2009).

Tabla 2

Clasificación taxonómica del género *Pseudomonas spp*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	GammaProteobacteria
Orden:	<i>Pseudomonadales</i>
Familia:	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genero:	<i>Pseudomonas</i>

Nota: Recuperado de (Bram Slabbinck B. D., 2010)

Controles biológicos

Existen distintos modos de control biológico para disminuir poblaciones de organismos patógenos, a niveles donde su impacto sea menor, describiéndose bajo un manejo integrado de plagas (MIP), dentro de estas especies bio reguladoras están los parasitoides que presentan adaptaciones biológicas, comportamientos y morfológicas que los distinguen de especies fitófagas (Diana Marcela Vinchira Villarraga, 2019).

El control microbiano puede estar ejercido por virus, bacterias, rickettsias, protozoarios, nematodos y hongos que ocasionan enfermedades o epizootias entre sus poblaciones, considerándose como una de las múltiples medidas validas bajo un criterio de manejo Agroecológico que conforman una agricultura sustentable (Jorge E. Ibarra, 2006).

Hongos entomopatógenos

Son microorganismos eucariontes, también llamados hongos imperfectos por el desconocimiento de su fase sexual (teleomorfa, ascógena o meiótica) con una reproducción por conidios (Cano Enilda, 2004). Su gran importancia en los agroecosistemas es debido a su capacidad de regular poblaciones de insectos, siendo esta dependiente de la susceptibilidad en la relación patógeno-hospedero, ya que para que exista una manifestación epizoótica esta debe estar correlacionada por la influencia de factores abióticos que determinan la persistencia y viabilidad, entre ellos la temperatura, rayos ultravioletas, fungicidas y humedad relativa; ya que los conidios para su germinación necesitan de requerimientos específicos de temperatura y agua que son inductores de este proceso (Micaela Pucheta Díaz, 2006). Una de las diferencias entre hongos entomopatógenos y agentes entomopatógenos; es que estos no requieren de ser ingeridos por la cavidad bucal de los insectos.

Presentan una pared celular constituida de un 80% por polisacáridos, lípidos del 1-10% de su peso seco, sales inorgánicas en cantidades menores y un 3-20% de proteínas, las microfibrillas están formadas por quitina siendo un polímero polisacárido no ramificado (N-acetil-D-glucosamina) donde sus monómeros son unidos por enlaces β -1,4 (Micaela Pucheta Díaz, 2006). Su coloración característica se debe a la presencia de melaninas producida por la oxidación de fenoles, esta pigmentación es de carácter protector a efectos deletéreos que son ocasionado por enzimas líticas y rayos ultravioleta (Ruiz-Herrera, 1991). Se han identificado alrededor de 700 especies agrupados en 100 géneros entre los más importantes están *Entomophthora*,

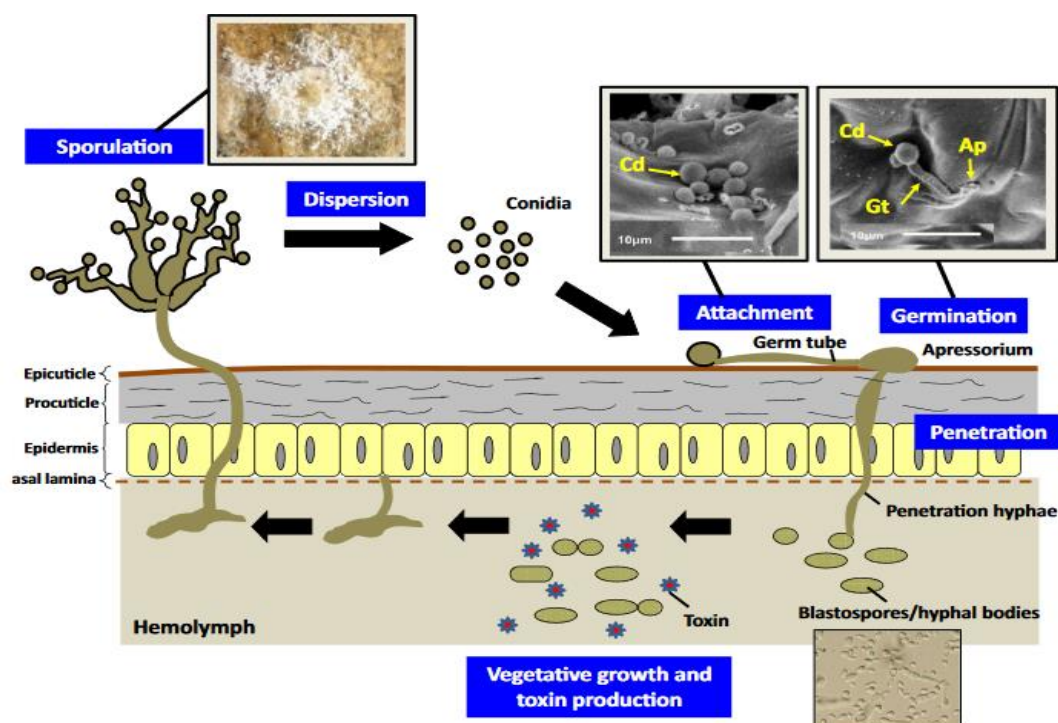
Akanthomyces, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Zoophthora*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Hymenostilbe*, *Verticillium* (Arnulfo, 2001).

Mecanismos de acción de hongos entomopatógenos

Su proceso infeccioso tiene inicio con la adhesión del conidio a la superficie del integumento del hospedero desarrollándose túbulos germinales y el apresorio (Figura 4), estableciéndose la relación patógeno-hospedero, en la que las concentraciones de iones divalentes de Ca^{+2} y Mg^{+2} pueden llegar a crear condiciones favorables para el establecimiento de los conidios debido a la afectación de la hidrofobicidad y reducción de las fuerzas de repulsión electrostática en la superficie de la cutícula del insecto (Barnes SE, 1997)

Figura 4

Proceso de infestación de hongos entomopatógenos en insectos huéspedes



Nota: Recuperado de (Gabriel Moura Mascarin *et al.*).

Adhesión de la espora a la cutícula del insecto

La adhesión de las esporas al integumento externo del hospedador depende de procesos físicos y químicos (Cano Enilda, 2004), en la que existe una capa de

moco adhesivo asociada a los conidios que actúa como antideslizante, además de proporcionar una protección a polifenoles tóxicos y enzimas del huésped que son secretados por su sistema inmunológico, por lo que la pared interna de las esporas se compone de una capa gruesa translúcida, recubierta de una sustancia mucilaginosa. Donde las interacciones espora-cutícula es un proceso bifásico de unión que se refleja en el tiempo de adhesión prolongado (12-48 h), que es requerido para la germinación y penetración de la cutícula de los insectos (Drion G Boucias, 1991). Este proceso puede ser interrumpido por poca humedad, incapacidad de sintetizar nutrientes que se encuentran disponibles en la superficie cuticular y micropliegues que evitan la señalización de inducción para el reconociendo de la superficie (Hajek A.E, 1994)

Germinación

La germinación de las esporas se inicia con humedades relativas mayores al 70% durante las primeras 14 horas, además de la presencia de carbohidratos que se encuentran en la cutícula del insecto, donde la hidratación es favorecida por la cubierta mucilaginosa de la espora, encontrándose esterasas y proteasas aun antes de su germinación en su superficie, posteriormente se desarrollara el tubo germinativo mediante un proceso de polimerización en la que los iones de H^+ y Ca^{2+} por un mecanismo de transporte pasivo ingresan a la punta de la hifa y son expulsados mediante un mecanismo dependiente de energía (Micaela Pucheta Díaz, 2006). Transcurrido este proceso se produce un apresorio o haustorio que le permite la adherencia y penetración de la hifa (Arnulfo, 2001). Por ello el estado de latencia permite a las esporas evitar la germinación en condiciones no optimas, involucrando el factor de transcripción autoinhibidor tipo Bzip alfa (Poppy C.S Sephton-Clark, 2018).

Penetración de la cutícula

Este proceso involucra dos tipos de mecanismos, los físicos que consisten en la ruptura de las membranas de la cutícula y las áreas esclerotizadas, por la presión ejercida de las estructuras de penetración; mientras que los mecanismos químicos involucran la acción enzimática que incluyen lipasas, quitinasas, proteasas y

lipooxigenasas que degradan la cutícula y proporcionan nutrientes al hongo (Arnulfo, 2001). Cada enzima cumple con una función específica en regiones de la cutícula, la región externa se encuentra formada por parafinas y ácidos grasos desintegrada por lipasas o enzimas lipolíticas, la quitina le confiere dureza y resistencia siendo esta asimismo afectada por las quitinasas y posteriormente las proteínas son desintegradas por enzimas proteolíticas (Herbert Torres, 1993).

Crecimiento del hongo en la región del hemocele del insecto

Su crecimiento prolifera con la formación de cuerpos hifales con una ramificación en la procutícula, que posteriormente se diseminan por el hemocele, invadiendo las estructuras como tubos de Malpighi, tejidos musculares, hemocitos y cuerpos grasos (Micaela Pucheta Díaz, 2006). Con la ruptura de la epicutícula se generan placas penetrantes provocando fracturas que facilitarán la expansión de enzimas; siendo estos cuerpos hifales similares a levaduras (blastosporas), por lo que estas transiciones morfológicas y producción de toxinas (sustancias inmunomoduladoras) son necesarias para superar las barreras inmunológicas del huésped en la que se involucran procesos de melanización, nodulación, fagocitosis y encapsulación (Hajek A.E, 1994).

Producción de toxinas

Entre las toxinas sintetizadas por hongos entomopatógenos se han identificado dextruxinas, protodextruxina y demetil-dextruxina (Arnulfo, 2001). Algunos metabolitos secundarios son con frecuencia estructuras complejas como complejos peptídicos cíclicos y lineales derivados de otros metabolitos primarios (Dayamí Borges, 2010). Las destruxinas pueden afectar objetivos organolares tales como retículo endoplasmático, membranas nucleares y mitocondrias, llegando a ocasionar parálisis celular y disfunción del intestino; mientras que otros depsipéptidos cíclicos cumplen funciones principalmente como ionóforos endocelulares, efrapeptinas y leucinostatinas (Hajek A.E, 1994).

Muerte del insecto

La muerte del insecto puede ocurrir por la combinación de algunos factores ya sea, por la invasión de múltiples órganos, enzimas del patógeno o por el nivel de toxicosis de los metabolitos, ya que muchas de las enzimas son determinantes en el nivel de virulencia del hongo, estando asociados con el estado de enfermedad del huésped (Douglas Inglis, 2001)

Desarrollo de la fase micelial

En este proceso ocurre mediante la colonización total del insecto convirtiéndose en una momia con aspecto blanco polvoriento, además en ciertos géneros de *Beauveria spp* cuando se produce este proceso los cadáveres son resistentes a la descomposición bacteriana (Douglas Inglis, 2001).

Emergencia del micelio al exterior de la cutícula

Esta etapa se desarrolla en condiciones favorables (humedad y temperatura), permitiendo que las hifas atraviesen el tegumento del insecto, que generalmente ocurre en las regiones menos esclerosadas como en el espiráculo o las membranas intersegmentales siendo dependiente del estado del hospedante (Elizabeth Araujo de Albuquerque Maranhão, 2009).

Producción y dispersión de unidades infectivas

Las hifas se mantienen en la fase vegetativa iniciando el proceso de esporulación, donde los conidióforos dan origen a esporas asexuales que son unidades infectivas que cumplen además con la función de dispersión, que dependen de la intervención del agua, viento, el hombre y otros microorganismos (Elizabeth Araujo de Albuquerque Maranhão, 2009).

Mecanismos de defensa de los insectos para la evasión de la infestación de hongos entomopatógenos

El principal mecanismo de reacción celular de defensa antifúngica de los insectos es la encapsulación del hongo, que consiste en la formación de una capsula que está constituida por células sanguíneas siendo esta dependiente del tamaño del

objeto 1) material particulado se dará una formación de nódulos y 2) capsulas si el objeto extraño supera el tamaño de las células sanguíneas; que posteriormente estará seguido del proceso de melanización de nódulos solo horas después de que se inició la encapsulación, continuando este proceso durante días. Las primeras células sanguíneas en reaccionar son los hemocitos que presentan gránulos aparentes en su citoplasma, se encuentran en contacto con los diferentes tejidos cercanos al hemocele como la pared intestinal, hipodermis, cordones nerviosos y túbulos de Malpighi o gónadas (Gotz, 1986).

Genero *Beauveria*

El género *Beauveria spp*, presenta una coloración de colonias con una superficie blanca, microconidios globosos que se agregan densamente alrededor, conidióforos corto e hinchado con un ligero dobles en su terminación en forma de zigzag, denominándose esta característica como geniculado, cada conidio nace en un plano diferente en donde el conidióforo gira, siendo de conidiación simpodial (Gary W.Procop, 2006)

Agostino Bassi di Lodi (1836) científico italiano, quien identifico por primera vez que la afectación a *Bombix mori* "gusano de seda" era ocasionado por *Beauveria Bassiana* catalogando esta enfermedad como la muscardina, en la que se describió los diferentes procesos de infestación, donde sus cuerpos muertos blandos y flexibles pasaban a un estado seco y duros volviéndose quebradizos similares al vidrio, recubriéndose de una capa de polvo (Bassi, 1836), por lo que se estableció presentes para futuros trabajos de investigación. Desde entonces esta especie es una de las más conocidas históricamente por su importancia económica, identificándose varios grupos como *Beauveria velata*, *Beauveria caledonica*, *Beauveria amorpha* y *Beauveria vermiconia* (Travis R. Glare A. J., 1998).

Características macroscópicas

Beauveria bassiana. Colonias levantadas con un color blanco, cambiando su coloración al reverso de la placa a coloraciones amarillentas cuando los cultivos tienen mucho tiempo en incubación (Carmen Elena Castillo, 2012).

Beauveria Vuillemin. Presenta un micelio blanco o ligeramente coloreado de aspecto esponjoso a polvoriento (HL. Barnett, 1972).

Beauveria vermiconia. En medios de cultivo PDA su crecimiento es moderadamente rápido con 2mm día a 20 grados centígrados, con centros ligeramente elevados desarrollando una banda de color amarillo pálido en el centro de la colonia con bordes blancos con a paraciencia polvoriento (Travis R. Glare T. A., 1993).

Beauveria bronginartii (Saccardo). Coloración blanco crema con aspecto algodonoso pulverulento, con una superficie semi elevada, siendo su crecimiento moderado después de los 20 días en medio de cultivo, presentando una pigmentación amarilla a un color rosa claro (Rojas-Gutiérrez René Leopoldo, 2017).

Características microscópicas

Beauveria Bassiana. Células conidiógenas globosas a sub-glosas con cuello muy corto (2-3 x 2.0-2.5 μm) formando estas estructuras grandes grupos, conidióforos apiñados que forman sinnemas o grupos muy juntos, conidios lisos y hialinas, globosas elipsoidales con un raquis en zig-zag donde emergen las esporas (Carmen Elena Castillo, 2012).

Beauveria vuillemin. Conidióforos agrupados irregularmente, solos o en clusters verticillact, en ciertas especies inflado en la base con una disminución hacia la porción fértil en zig-zag, después de varios conidios redondeadas a ovoides, 1 celda, secas, que nacen en dentículos pequeños (HL. Barnett, 1972).

Beauveria vermiconia. Presenta conidios ligeramente largos con 1-1,5 μm en vista de frente y 2,5 μm en vista lateral en forma de coma u hoz, un raquis largo con

dentículos, células conidiógenas estrechamente agrupadas en una porción basal hinchada (Travis R. Glare T. A., 1993).

***Beauveria bronginartii* (Saccardo).** Conidios solitarios y en grupos ralos irregularmente denso, conidióforos en forma de racimos con hifas en Zig-Zag en el ápice, producción de conidios en cada punto de flexión, presentan una base apicularmente estrecha hialinos y elipsoides (Rojas-Gutiérrez René Leopoldo, 2017).

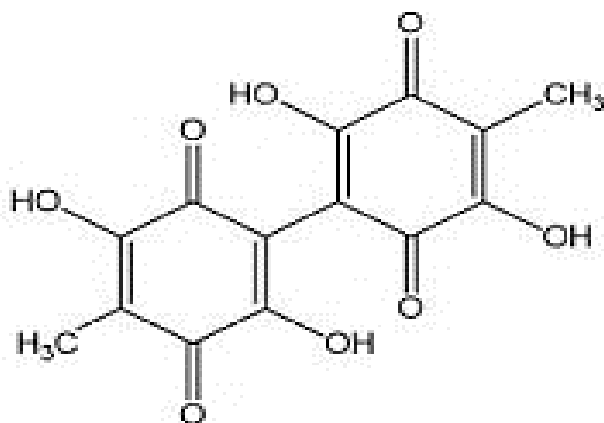
Metabolitos secundarios del género *Beauveria* spp.

Dentro de los metabolitos primarios fúngicos del género *Beauveria* spp están los que se encargan del crecimiento celular, viabilidad y proliferación que son necesarios hasta la diferenciación y esporulación. Los metabolitos secundarios son secretados una vez que los requerimientos nutricionales en el medio se agotan, y se inicia un proceso de producción de ácidos orgánicos, pigmentos y antibióticos. Siendo así que las moléculas derivadas de los metabolitos secundarios son necesarias para la respuesta toxica una vez iniciada la infección que contribuyen a la muerte del insecto, por lo que algunos de estos presentan una actividad antimicrobiana contra su microbiota. A continuación, se detallan las diferentes estructuras de las moléculas producidas por *Beauveria* spp.

Oosporeína: Es un pigmento de naturaleza benzoica derivada del C2 simétrico 2,5-dihidroxibenzoquinona, con su fórmula empírica $C_{14}H_{10}O_8$, identificándose por primera vez en 1960 del derivado simétrico 1,4-benzoquinona, mediante un análisis de difracción de rayos X. Presenta una estabilidad alta en condiciones de acidez ($pH < 5$) debido a que es un ácido orgánico fuerte con una baja lipofilia. Su peso molecular es de 306,226 g/mol con nombre IUPAC 2,2',5,5'-Tetrahidroxi-4,4'- dimetil-1,1'-bi(1,4- ciclohexadieno-1-il)- 3,3',6,6'-tetrona (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Figura 5

Estructura química de la Oosporeína

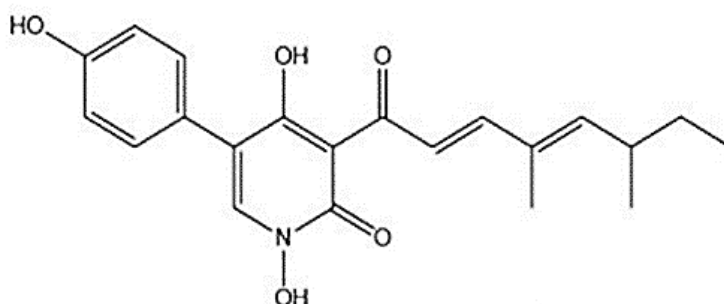


Nota: Recuperado de (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Tenellin: Es un pigmento amarillo derivado del 2-piridona (1,4-dihidroxi-5-(p-hidroxifenil)-2(1H)-piridina) formandose a partir de una cadena de policétidos reducidos con una porcion amida de la tirosina, posee una formula empirica $C_{21}H_{23}NO_5$ con su nombre IUPAC 3- [(E,E)-4,6-dimetilocta-2,4-dienoil] y con un peso molecular de 369, 417 g/mol (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Figura 6

Estructura química de Tenellin



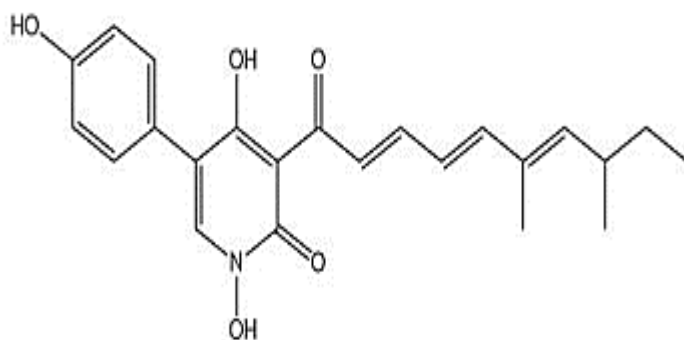
Nota: Recuperado de (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Bassianina: Es un pigmento amarillo que se forma a partir de cadena policéticos (Hexakétidos) con un peso molecular de 395,455 g/mol con una formula

empírica $C_{23}H_{25}NO_5$ y nombre IUPAC 3-[(2E,4E,6E)-6,8- Dimetil-2,4,6- decatrienoil]-1,2- dihidroxi-5-(4- hidroxifenil)-4(1H)- piridinona, siendo derivados del 1,4-dihidroxi-2-piridona al igual que tenellin con la única diferencia en la extensión de su cadena lateral (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Figura 7

Estructura química de Bassianin

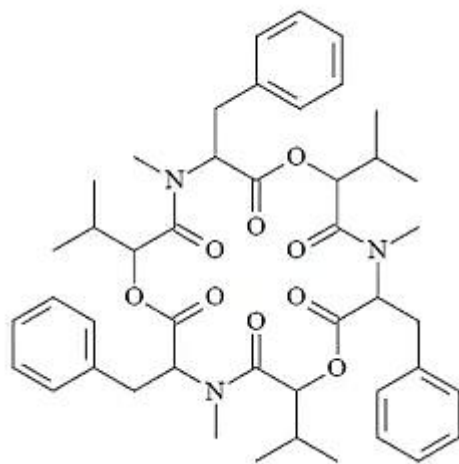


Nota: Recuperado de (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Beauvericina: Es un ciclopeptido trimerico constituido por residuos alternados de hidroxivalerilo e metilfenilalanilo, con un peso molecular de 783,9 g/mol. Siendo esta una micotoxina con actividad insecticida, antibiotica, agente antineoplásico e inhibidor de la apoptosis, por lo que es considerado como un ionóforo que tiene la capacidad de transportar iones a través de las membranas lipídicas, formando canales de cationes selectivos en células de mamíferos afectando directamente proporcionalmente las concentraciones de iones intracelulares que ocasionaría la interrupción de la contracción divalente y monovalente de cationes además contribuyendo a la hidrólisis de ATP que ocasionaría la apoptosis celular (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Figura 8

Estructura química de Beauvericina



Nota: Recuperado de (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020).

Hipótesis

Los distintos aislados del género *Beauveria spp* presentan efectos bioplaguicidas y antibacterianos similares para el control biológico de *Cosmopolites sordidus* y el género *Pseudomonas spp*, respectivamente, en el Ecuador.

Capítulo III

Materiales y métodos

En el presente trabajo de investigación la fase experimental se llevó a cabo en los laboratorios del área de microbiología y biología molecular del departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe extensión Santo Domingo-Ecuador, en el periodo de octubre 2021- febrero 2022.

Material biológico

La parte experimental se desarrolló en dos fases. La fase de campo que consistió en realizar una recolección de muestras de suelo en monocultivos de *Zea mays*, especímenes de *Cosmopolites sordidus* y frutos del café (*Coffea canephora*) en zonas rurales pertenecientes a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Además, se utilizaron dos formulados comerciales con base activo de esporas del género *Beauveria spp* de las empresas Bioamecsa y Ecuaplantas distribuidos y expendidos en los diferentes agroinsumos a nivel de la provincia. En la fase de laboratorio se emplearon protocolos para el aislamiento, purificación y caracterización de colonias de hongos, pruebas de patogenicidad, antibiogramas y secuenciación.

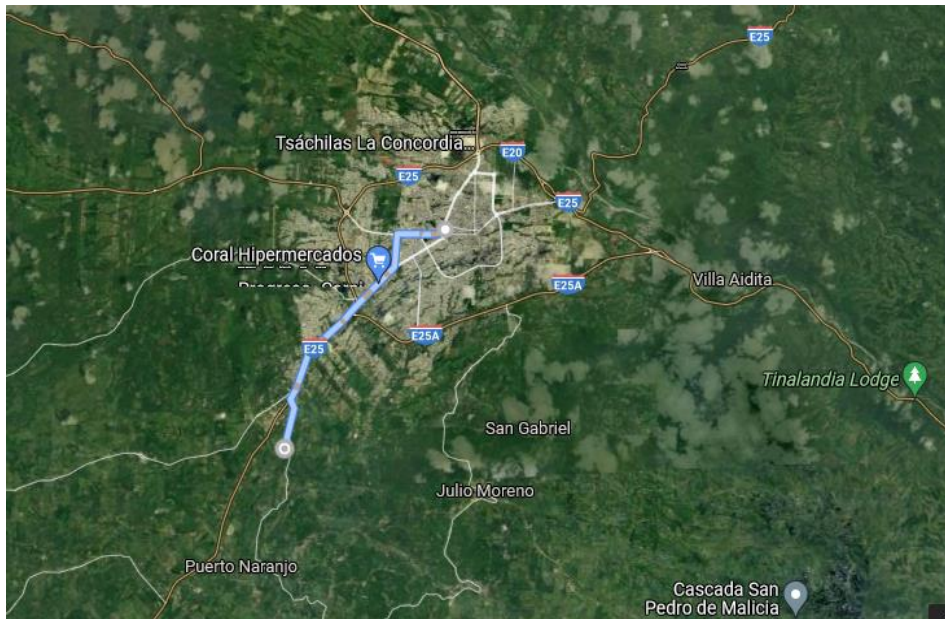
Fase de Campo

Recolección de muestras de suelo y especímenes de *Cosmopolites sordidus*

La toma de muestras de suelo fue obtenida de monocultivos de *Zea Mays* con antecedentes de haber sido cultivado por 10 años aproximadamente en el mismo lugar. La recolección de los especímenes de *Cosmopolites sordidus* fue realizada en la plantación de plátano de la variedad barraganete dentro del mismo predio, finca "La pepa de oro", ubicada en la parroquia Rio Verde, cantón Santo Domingo, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas con coordenadas 0°18'19.1"S 79°13'04.3W a 610 msnm, con una temperatura anual promedio de 23.2° C.

Figura 9

Ubicación de la toma de muestras de suelo y especímenes de *Cosmopolite Sordidus*



Las muestras de suelo fueron recolectadas siguiendo la metodología propuesta por Manuel Hernández *et al.* (2011), en una superficie de 10 metros cuadrados se marcó tres puntos complemente al azar y se recolecto una muestra de los primeros 15 centímetros, retirando previamente la capa de materia orgánica. Se recolecto aproximadamente 300 gramos de suelo por cada perforación obteniendo un total de un 1 kilogramo al final (Manual Hernández Velázquez, 2011). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas plásticas hasta su traslado al laboratorio de microbiología en un lapso de 3 horas para su procesamiento.

La captura de especímenes de *Cosmopolites sordidus* se desarrolló en base a la metodología propuesta por Dairys García-Perera *et al.* (2019) empleando trampas tipo sándwich en el pseudotallo (Ver la sección de anexos) en plantas cosechadas horas antes; y que no hayan recibido algún tratamiento químico o biológico. Los especímenes fueron recolectados al día siguiente en horas de la mañana en viales de vidrio que contenían fragmentos o trozos del pseudotallo, ya que estos insectos poseen una actividad nocturna, y se mantuvieron en temperatura ambiente, a un

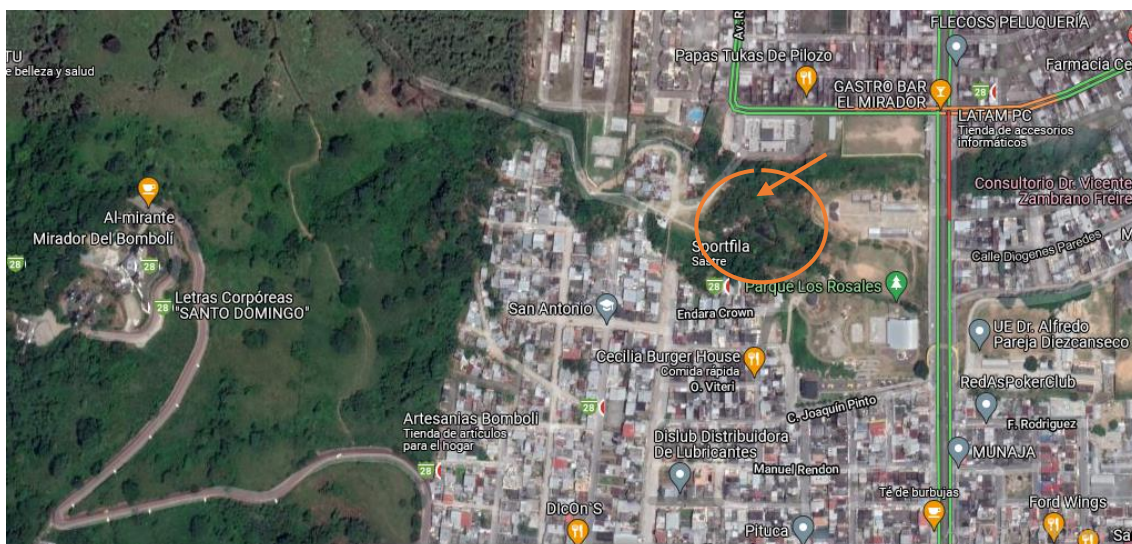
fotoperiodo de 12 horas, para su establecimiento en cuarentena por un periodo de 7 días para determinar que hubiesen sido infectados por otros patógenos, previamente (Dairys García-Perera, 2019).

Recolección de frutos de café con manifestaciones fúngicas

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos, fueron recolectados frutos de cafetales con evidencia de perforaciones en el disco o corona provocados por *Hypothenemus Hampei* "broca del café" (Ver la sección de Anexo), estos frutos aún se encontraban en un estado de inmaduros, ya que tenían una coloración verde típica. Se recorrió un total aproximado de una hectárea, donde estos cultivos presentaban un mal manejo en cuanto a sus podas anuales. La zona de recolección está localizada dentro del casco urbano del cantón Santo Domingo, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas con coordenadas $0^{\circ}14'46.8''S79^{\circ}11'10.8''W$ a 625 msnm, con una temperatura anual promedio de $23.2^{\circ}C$.

Figura10

Zona de recolección de frutos de café con evidencia fúngica a nivel macroscópico



Los frutos fueron extraídos de forma manual empleando guantes de látex de uso quirúrgico, recolectándose solo aquellos que presentaron dichas características antes mencionadas y depositándolos en fundas herméticas, para su traslado al área

del laboratorio de microbiología, departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de la Fuerzas Armadas Espe extensión santo domingo.

Fase de laboratorio

Esta etapa se desarrolló mediante el establecimiento de protocolos, uso de equipos y reactivos de los laboratorios de microbiología y biología molecular.

Método de aislamiento de hongos entomopatógenos

El aislamiento de los hongos entomopatógenos fue realizado mediante la aplicación de tres métodos, a) Dilución seriada; b) Método Directo y c) Insecto trampa, puesto que el inóculo proviene de planta, suelo o insectos que presente características de una micosis. Los medios de cultivo artificiales empleados para su propagación fueron agar papa dextrosa (PDA) y sabouraud dextrosa agar (SDA) suplementados con los antibióticos respectivos para evitar la contaminación bacteriana.

Métodos directos

Su desarrollo se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Monzón (2001) para el aislamiento de hongos a partir de los frutos de café recolectados. Se procedió a realizar un raspado de la zona disco o corona con un asa bacteriológica estéril donde hubo un claro crecimiento fúngico, además se tomaron los cadáveres de insectos presuntamente *Hypothenemus hampei* en las zonas de ingreso a las perforaciones en el fruto que presentaban una infestación fúngica. El micelio obtenido se sembró en medio de cultivo PDA suplementado con estreptomycinina 300 ug/L. La esterilización del medio se efectuó a una temperatura de 121°C, 1 atm de presión durante 30 minutos, agregando el antibiótico estreptomycinina a una temperatura promedio de 50 °C bajo la campana de flujo laminar. Las placas Petri se sellaron con cinta Paraflim y se dejaron en incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 7 días en ausencia de luz.

Dilución seriada

Para el aislamiento de hongos del suelo se lo realizó mediante la técnica de dilución en placa, que consistió en homogenizar las sub muestras recolectadas en campo y procesarla en un tamiz con orificios de 2mm. La solución madre se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL al cual se le colocó 99 mL de agua destilada esterilizada más un 1 gramo de suelo tamizado, se agitó durante 3 minutos hasta observar la dilución total del suelo; en tubos de ensayo de tapa rosca previamente esterilizados se agregó 9 mL de agua destilada esterilizada para llevar hasta la dilución 10^{-5} . Se efectuó la siembra de 100 μ L de las diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-5} en la superficie de los medios de cultivo PDA suplementado con estreptomicina a 300 μ g/L; realizándose tres repeticiones por cada factor de dilución. Este procedimiento se lo llevo a cabo en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación con otros microorganismos (Ver la sección de anexos).

Siembra y aislamiento de productos comerciales

El proceso se lo desarrollo mediante la dilución de los formulados comerciales a base activo de esporas, procediendo a pesar 1 gramo del producto y disolverlo en 10 mL de agua destilada y esterilizada, homogenizando la muestra durante 3 minutos. Se efectuó la siembra de superficie con 100 μ L de la dilución en medios de cultivo PDA suplementados con estreptomicina a una concentración de 300 μ g/L. Se sellaron las placas Petri con cinta Parafilm y se dejó en incubación en ausencia de luz a una temperatura de 25 ± 2 °C por un periodo de tiempo de 7 días.

Métodos de purificación de hongos

Transcurrido un periodo de incubación de 7 días de los medios de cultivo PDA a una temperatura de 25 ± 2 °C se procedió a realizar la resiembra sucesiva de las colonias de hongos, para lo cual se tomó parte del micelio con un asa bacteriológica esterilizada y se sembró en nuevos medios de cultivo PDA, tomando solo aquellos que las características macroscópicas presentadas por las colonias eran diferentes.

Este procedimiento se efectuó tanto para el aislamiento de hongos del suelo, como los productos comerciales con base activo de esporas de *Beauveria spp.*

Obtención de cultivo monospórico

Para el establecimiento de la colección de hongos se siguió la metodología propuesta por el Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima-Perú, 2004.

Se realizó una solución de tween 20 al 0,4% para preparar una suspensión de esporas a partir de los aislamientos, con un periodo de incubación de 7 días a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en medio de cultivo PDA suplementado con estreptomicina a una concentración de 300 ug/L. En un tubo Eppendorf de 2 mL se colocó 1 mL de la solución de tween al 0.4% y se añadió una porción pequeña de micelio del hongo, posteriormente se lo llevo al vortex durante 1 minuto.

Para el establecimiento de la concentración del número de esporas por mililitro se empleó el hematocímetro o cámara de Neubauer, realizando su recuento bajo un microscopio óptico utilizando un objetivo de 40x. Se realizó diluciones seriadas tomando 100 μl de la suspensión anterior y agregando 900 μl de tween al 0,4% en un nuevo tubo Eppendorf; finalmente el producto fue agitado mediante vortex por 1 minuto, este procedimiento se llevó a cabo hasta obtener una concentración de 30 a 100 esporas por mililitro. Se realizó una siembra de superficie con 100 μL de la dilución 10^{-3} y se dispersó por el medio con ayuda de una espátula de Drigalsky, se sellaron las placas Petri y se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz por un periodo de 5 días.

Caracterización macroscópica de los aislamientos

Se empleó la metodología propuesta por Patricia E. Vélez-A *et al.* (2000), para la evaluación de las tasas de crecimiento diametral de los diferentes aislados en medios de cultivo PDA crecidos a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz. Se procedió a inocular en el centro del medio de cultivo 5 μl de una suspensión de 1×10^6 esporas/mL con un total de 3 repeticiones por aislamiento. Se registraron sus

diámetros a partir del 5 día de incubación y al cabo de éste, se tomaron mediciones cada 2 días durante un periodo de tiempo de 15 días; el procesamiento de la información consistió en tomar la tasa promedio de crecimiento diario por cada aislamiento. Para la caracterización cultural se empleó la metodología propuesta por Carmen Elena Castillo *et al.* (2012) para describir aspectos de las colonias, pigmentación del medio, borde y color.

Caracterización microscópica de los aislamientos

Para la identificación principalmente de estructuras como hifas y conidios de las diferentes cepas aisladas fue utilizada la metodología propuesta por Verónica Cañedo & Teresa Ames (2004).

Se procedió a realizar una punción en el centro del medio de cultivo PDA con ayuda de una aguja de disección que contenía micelio del hongo. Dejando en incubación durante 4 días a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$ C en ausencia de luz para luego tomar parte del micelio con una aguja de disección y realizar la tinción de las estructuras con una gota del reactivo azul de lactofenol sobre un cubre objetos, para su observación en un microscopio óptico a un objetivo de 100x.

Caracterización morfológica de *Cosmopolites sordidus*

Se compararon las diferentes estructuras de los insectos adultos *Cosmopolites sordidus* siguiendo las descripciones taxonómicas propuestas por Luis Fernando Vallejo *et al.*, 2007; Paula Sepúlveda *et al.*, 2009; para la confirmación de la especie. Estas estructuras fueron observadas en un estereomicroscopio de la marca labomersa a un lente objetivo de 4x.

Establecimiento de los insectos bajo condiciones de laboratorio

Los insectos que fueron recolectados en cultivos de plátano de la variedad barraganete siguiendo la metodología propuesta por Dairys García-Perera *et al.* (2019). Fueron conservados en placas Petri esterilizadas con un diámetro de 9 centímetros sin sellar sus bordes para permitir el ingreso de oxígeno, manteniéndose

a temperatura ambiente dentro de las instalaciones del laboratorio (temperatura promedio 20 °C) con un fotoperiodo de 12/12 horas.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se obtuvo a partir de micelio, siguiendo la metodología propuesta por S.B Lee *et al.* (1988), donde se procedió a realizar un raspado del micelio del medio de cultivo PDA con un tiempo de incubación de 7 días a una temperatura de 25 ± 2 °C, posteriormente por separado se pesó el micelio en una balanza analítica cada una de las cepas previamente identificadas mediante características macroscópicas y microscópicas, se reportó sus respectivos pesos y fueron colocados en morteros para su maceración, se añadió 10 mL de nitrógeno líquido para lograr obtener un polvo de color blanco uniforme. Se transfirió el micelio macerado en un tubo Eppendorf de 2 mL y se adiciono 750 ul del buffer de lisis (50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoetanol), llevándolo al vortex durante 1 minuto para que la mezcla sea homogénea, luego se incubó a 65°C durante 1 h a baño María. Posteriormente se adicionó 700 ul de cloroformo:fenol (1:1) y se mezcló mediante vórtex brevemente. Seguidamente los productos fueron centrifugados a 12.000 x g durante 10 minutos o hasta que la fase acuosa (superior) sea transparente. Se colectó 600 ul de fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf, con cuidado de no tomar restos de la interfaz, a la que se le adiciono 700 ul de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamylico: 24:1), agitándose brevemente y centrifugándose por 5 minutos a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se retiró 550 ul de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf añadiéndole 20 ul de NaOAc 3M y llenando hasta el límite del tubo con Ethanol previamente incubado a -20 °C. Se invirtió suavemente varias veces para observar el precipitado de ADN. Posteriormente se centrifugaron como se indicó anteriormente durante 30 segundos para sedimentar el ADN, luego se eliminó el sobrenadante y se invirtió los tubos durante 1 minuto para su drenado. Se adiciono 300 ul del buffer TE y se llevó al vortex durante un minuto para resuspender el pellet y se colocó a baño maría durante 10 minutos a 65°C. Luego

se adiciono 10 ul de NaOAc 3M y se llenó el tubo Eppendorf con EtOH a -20 °C. Posteriormente se centrifugó como se indicó anteriormente durante 2 minutos para sedimentar el ADN y se vertió el sobrenadante, enjuagando el precipitado con EtOH al 70% e invirtiendo los tubos durante un minuto para su drenado. El secado los tubos se realizó en una estufa a 50°C durante 10 minutos para evaporizar el EtOH que haya quedado después del drenado, se resuspendio el pellet en 70 ul de agua destilada esterilizada y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento de amplificación de las regiones ITS.

Reacción en cadena de la polimerasa para regiones ITS1, ITS4

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las muestras de ADN se siguió la técnica propuesta por T.J White *et al.* (1990) para hongos entomopatógenos, bajo las condiciones especificadas en la tabla 2, empleando los iniciadores universales para el espaciador del transcripto interno de los genes ribosomales; para ello se emplearon los iniciadores ITS1 (forward) 5`TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3` e ITS 4 (reverse) 5`TCCTCCGCTTATTGATATGC 3`, los reactivos utilizados para la obtención de los productos de PCR se encuentran listados en la tabla 3.

Tabla 3

Especificaciones de las concentraciones de los reactivos del Máster Mix

	Inicial	Final	Vx1	Vx2
Agua	-----	-----	16,9 μ L	33,8 μ L
Buffer	10x	1x	2,5 μ L	5 μ L
ITS 1	10 μ M	0,4 μ M	1 μ L	2 μ L
ITS 4	10 μ M	0,4 μ M	1 μ L	2 μ L
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1 μ L	2 μ L
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,5 μ L	1 μ L
Tap polimerasa	5 U/ μ L	0,5 U/ μ L	0,1 μ L	0,2 μ L
ADN	-----	2 μ L	2 μ L	----
Total		25 μ L		

Nota: μ M: micromolar; μ L: microlitros; U: Unidades; MgCl₂: Cloruro de magnesio;

dNTP: Desoxinucleotidos; mM: Milimolar; ITS 1 e ITS 4: Iniciadores

Tabla 4.

Condiciones de reacción de amplificación de regiones ITS

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 °C	3 minutos	1
Inicial			
Desnaturalización	93 °C	30 segundos	
Hibridación	58,6 °C	30 segundos	35
Extensión	72 ° C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
Conservación	4 °C	5 minutos	

Nota: Recuperado de T.J White *et al.* (1990).

Secuenciación de las amplificaciones de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer)

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa de aproximadamente 600 pb fueron enviados para su respectiva secuenciación a la empresa IDGEN. La calidad de las muestras fue evaluada mediante espectrofotometría de microvolúmenes (ng/ul).

Patogenicidad de los aislados de *Beauveria bassiana*

Para evaluar la capacidad de infección de los diferentes aislados de hongos del género *Beauveria spp*, se siguió la metodología propuesta por Rogério Biaggioni Lopes, (2011).

Se emplearon solo los insectos sanos que fueron sometidos a cuarentena, siendo un total 7 insectos por cada tratamiento. Las cepas utilizadas tenían un tiempo de incubación de 15 días en medio de cultivo PDA a una temperatura de 25 ± 2 °C en ausencia de luz. La preparación de la solución de esporas se realizó raspando con una espátula de metal estéril parte del micelio del hongo y se re suspendió en una solución de Tween 20 al 0,4 %, para determinar una concentración de 10^6 esp/mL utilizando la cámara de Neubauer. Posteriormente se sumergieron los insectos en la solución de esporas durante 90 segundos, para luego ser llevados a cajas Petri esterilizadas sin sellar sus bordes para permitir el ingreso de oxígeno. Los insectos de control se sumergieron solo en agua destilada esterilizada. Transcurrido un periodo de tiempo de 24 horas los insectos muertos fueron retirados a nuevas cajas Petri esterilizadas, que en su interior se adiciono papel filtro estéril humedecido con agua destilada esterilizada para obtener una humedad relativa sobre el 90% y observar una micosis evidente en los cadáveres de los insectos.

Extracción de metabolitos de *Beauveria Bassiana*

Para la evaluación antimicrobiana se emplearon extractos crudos de los aislamientos de *Beauveria bassiana* siguiendo la metodología propuesta por Jesús M. Villegas-Mendoza *et al.*

Se procedió a retirar el micelio de los medios de cultivo sólidos (PDA) que tenían un periodo de incubación de 10 días, para ello se empleó una espátula de metal esterilizada. Posteriormente se dejó el micelio en remojo durante una semana en matraces Erlenmeyer de 500 mL a los que se les agregó 100 mL de metanol, y se sellaron con cinta Parafilm para evitar la evaporación. Luego se recuperó el micelio por medio de papel filtro, llevándose este extracto a una evaporación en un rotavapor a 45°C aplicando vacío.

Conservación del material biológico

Para el mantenimiento y conservación de las diferentes cepas de hongos aislados a partir de los productos comerciales y muestras de suelo se siguió la metodología propuesta por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad (SANASICA) – México.

Se procedió a emplear el método de conservación con aceite mineral que no permite la evaporación del agua contenida en el medio de cultivo, limita la presencia de oxígeno disponible y evita el incremento de la concentración de los solutos que provocan el ascenso de la presión osmótica. Para ello se utilizó tubos de ensayo de vidrio de 30 mL con tapa rosca, agregándoles 10 mL de medio de cultivo PDA y se esterilizó a 121 °C a 1 atm de presión durante 40 minutos cuando alcanzaron una temperatura de 50°C se añadió el antibiótico estreptomina a una concentración de 300 ug/mL. Posteriormente se inclinaron a un ángulo de 45 grados para la solidificación del medio de cultivo. La siembra del hongo se la realizó por estría con ayuda de un asa bacteriológica y se dejaron en incubación a 25°C en ausencia de luz durante 7 días hasta alcanzar la fase de esporulación. La esterilización del aceite

mineral se efectuó en dos pasos, la primera consistió a 121 °C por 15 minutos a 1 atm de presión, que transcurrido 48 horas se realizó la segunda esterilización a 180 °C por una hora. Se cubrieron los cultivos con 8 mL de aceite mineral corroborando que el nivel quede por encima de alrededor de un centímetro del medio de cultivo y sellando las tapas con cinta Parafilm. Se etiquetaron los tubos y se almacenaron a 4 °C. Posteriormente se realizó una prueba de control a los 7 días de almacenamiento para verificar su viabilidad y que se encuentren libres de contaminantes.

Diseño estadístico

Patogenicidad de los aislados de *Beauveria*

El tratamiento de los datos fue procesado en el software estadístico Statistics mediante una estadística descriptiva aplicando la prueba Chi-Cuadrado. Para determinar si existe independencia en la relación patogenicidad de los aislados con respecto al tiempo de inoculación en los insectos *Cosmopolites sordidus*.

Ho = Los diferentes aislamientos de *Beauveria Bassiana* presenta una patogenicidad frente al género *Cosmopolites sordidus* es independiente del tiempo de inoculación en una concentración de 10^6 esp/mL.

Ha = Los diferentes aislamientos de *Beauveria Bassiana* presenta una patogenicidad frente al género *Cosmopolites sordidus* dependiente del tiempo de inoculación en una concentración de 10^6 esp/mL.

Extractos metanólicos de *Beauveria Bassiana*

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Beauveria bassiana* obtenidos por procesos metanólicos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y una prueba de significación de Tukey.

Ho= Los extractos crudos de los aislamientos de *Beauveria bassiana* no presentan una actividad antibacteriana para el género *Pseudomonas spp*.

Ha= Los extractos crudos de los aislamientos de *Beauveria bassiana* presentan una actividad antibacteriana para el género *Pseudomonas spp*

Capítulo IV

Resultados y discusión

Aislamiento de *Beauveria spp* de productos comerciales

En los aislamientos del producto comercial Beauvetic incubados en medio PDA a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ se observó un crecimiento de micelio transcurrido 8 días de su siembra presentando un color blanco con aspecto algodonoso terciopelado y una pequeña elevación durante su crecimiento, que al transcurrir 20 días se tornaron de aspecto pulverulento; con un reverso de coloración amarillo pálido en su fase de crecimiento y amarillo oscuro transcurrido los 20 días. Adicionalmente, se observó la formación de dos colonias con micelio de color lila de bordes regulares, con una rugosidad en su centro y al reverso una coloración marrón oscuro en el centro de la colonia (Ver en anexos), que correspondían a características morfológicas previamente reportadas.

En los aislamientos del producto comercial Beaussiana utilizando las mismas condiciones de siembra y medios de cultivos anteriormente mencionados, se obtuvo el crecimiento de dos tipos de colonias, la primera presento un micelio de color verde con sus bordes irregulares y una coloración amarillo pálido, con un reverso de color grisáceo; mientras que las colonias de color blanco tenían un aspecto algodonoso semielevado, con bordes regulares que se encontraban inmersas dentro de las colonias de color verde; con un reverso de coloración amarillo pálido. Cabe mencionar que a los siete días de incubación se había perdido gran parte del micelio de color blanco, que desapareció totalmente transcurrido 20 días. Por tal razón en las características macroscópicas como el crecimiento del micelio, color, aspecto y de pigmentación en medios de cultivos sintéticos de cada uno de los aislamientos presentaron diferencias notorias, siendo resultados similares a los descritos por Varela y Morales (1996) en la caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana*. Aislamiento de hongos entomopatógenos de muestras de suelo.

A los dos días de la respectiva siembra de superficie en los medios de cultivos PDA suplementados con estreptomycin a una concentración 300 µg/mL en donde en las diluciones de 10^{-2} hasta 10^{-5} se obtuvo un crecimiento bacteriano significativo siendo mayor al 80% en las diluciones de 10^{-2} ; 10^{-3} y de menor incidencia en la dilución 10^{-5} con un 40%, en la que se presentaron colonias bacterianas de color crema y amarillas. Tras la suplementación de ácido láctico se disminuyó considerablemente la formación de colonias bacterianas bajando hasta un 95% la contaminación, permitiendo el crecimiento de micelio, que presentaron un color verde, gris, crema, negro y blanco, identificándose por características macroscópicas y microscópicas como aislamientos de hongos no entomopatógenos.

Aislamiento de *Beauveria spp.* de *Hypothenemus hampei*

Las cepas de *Beauveria spp.* fueron aisladas de los frutos de *C. canephora* de la región de la corona o disco de las perforaciones de los frutos (Ver la sección de anexos), en los cuales se evidenciaron micelios de un color blanquecino. Fueron observadas las características morfológicas de los insectos, por medio de la utilización del estereomicroscopio utilizando un objetivo 4x, determinando que se trataban de insectos de *Hypothenemus hampei*, de acuerdo a las similitudes descritas por Luis Constantino *et al* (2011). A los 5 días de la incubación en medios de cultivo PDA a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ suplementados con estreptomycin 300 µg/m, se observó un crecimiento de micelio con aspecto algodonoso de color blanco con bordes irregulares que se extendían con apariencia de malla, presentando un crecimiento rápido y al reverso se visualizó una coloración rosácea (Figura 11), los aislados obtenidos fueron utilizados en futuros análisis, para determinar mediante caracterizaciones morfológicas su pertenencia al género *Beauveria*. Se pudo observar que el control biológico de *Hypothenemus hampei* se debió a hongos entomopatógenos, lo cual resulta interesante, aunque el origen de los mismos es desconocido. Cabe recalcar el reporte de la presencia de *Beauveria* de forma natural en los distintos suelos del mundo por varios autores (IreneVänninen, 1996); (Peter,

2009); (Michael J Bidochka, 1998). Así como se ha podido identificar el control biológico de distintas larvas y crisálidas de Lepidóptera, así como la incidencia natural de *Beauveria bassiana* en el control de *Hypothenemus hampei* (María Elena Estrada, 2004); (Acuña González, 2007) .

Purificación del aislamiento de *Beauveria spp* de *Hypothenemus hampei*

Con la técnica de resiembra sucesivas se establecieron colonias con micelio de color blanco de aspecto algodonoso semi-elevado, con bordes regulares, y al reverso una coloración amarillo pálido que se tornó más oscuro al transcurrir el tiempo, en la que ya no se visualizó el color rosáceo inicialmente observado antes de su siembra. Cabe mencionar que su incubación se realizó a las mismas condiciones de temperatura y medios de cultivo empleados para el aislamiento del micelio presente en los cadáveres de los insectos *Hypothenemus hampei* como se observa en la figura 11. En las características microscópicas observadas como el raquis en forma de zigzag que en su base emergen las esporas con un tamaño y forma globosos o sub-globosos coinciden con lo descrito por Sanson (1998) en el atlas de hongos entomopatógenos lo que nos permitieron determinar que todos los aislamientos pertenecen al género *Beauveria spp* sin embargo se presenta una limitante para el establecimiento de cepas por medio de estas estructuras debido a que son estrechamente relacionadas, como lo señala Nicolaza Pariona (2007) en la que es necesario realizar más estudios fisiológicos y moleculares que nos permitan identificar su identidad.

Figura 11

Características macroscópicas de *Beauveria bassiana*



Cultivos monospóricos de los aislados de *Beauveria* spp.

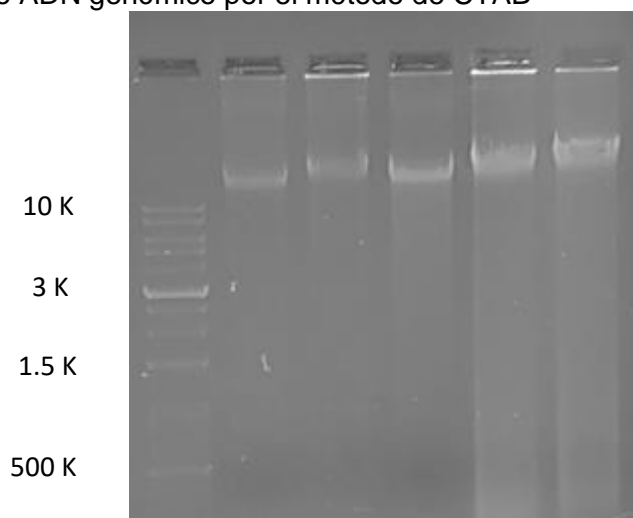
Para poder obtener aislados individuales tanto de los productos comerciales como de los hongos obtenidos de *Hypothenemus hampei*, se lo realizó mediante cultivos monospóricos, cultivados en un periodo de 48 horas de incubación a una temperatura de 25 ± 2 ° C en medios de cultivo PDA suplementados con estreptomycin 300 µg/mL se logró visualizar la formación del tubo germinativo además de un claro crecimiento en cuanto a su tamaño. Este cambio fisiológico se debe principalmente a la adaptación a un estado metabólicamente activo caracterizado por cambios en la fisiología y composición de la pared celular que dan inicio al crecimiento isotrópico; marcando el incremento del tamaño de la espóra que conducirá al crecimiento de hifas, por lo que todos estos cambios se deben a procesos transcripcionales, fisiológicos y bioquímicos durante la reprogramación celular en el tiempo de germinación (Poppy C.S Sephton-Clark, 2018). De los aislados obtenidos se identificaron por características morfológicas un total de cinco cepas los cuales fueron codificados para su identificación para el producto Beauvetic C1-100 JM; C2-100 JM; C3-100 JM; para *Beaussiana* B-102 JM y para el aislamiento de *C. canephora* como BC-101 JM, las cuales fueron utilizados posteriormente para su identificación molecular.

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de las cepas previamente obtenidas fue visualizada mediante la técnica de electroforesis. Mediante esta técnica se pudo observar fragmentos superiores a los 10,000 pb en los cinco aislamientos como se observa en la figura 12, los cuales corresponden con el ADN genómico, todas las muestras de ADN presentaron una buena calidad en cuanto a una banda notoria en su visualización en un gel de agarosa al 2%. Las bandas de ADN de las cinco cepas aisladas, presentaban pesos similares las obtenidas en la investigación de aislamiento de hongos entomopatógenos de muestras de suelos; en las que se obtuvieron bandas compactas cercana a los 12,000 pb (Ana Martha Cruz-Avalos, 2016), por lo cual se puede concluir que el ADN genómico aislado corresponde a hongos entomopatógenos.

Figura 12

Extracción de ADN genómico por el método de CTAB



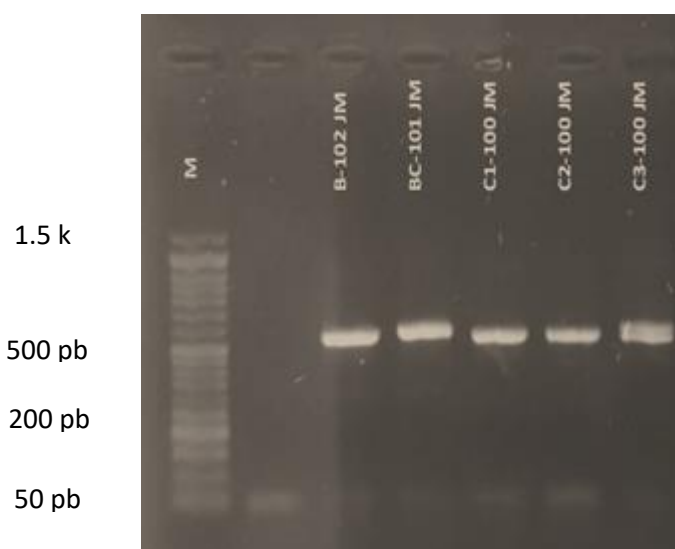
Nota: Carril 1: Ladder 1kb Plus Opti-DNA (OBM), carril 2: B-102JM; carril 3: BC-101JM; carril 4: C1-100JM; carril 5: C2-100JM; carril 6: C3-100JM

Amplificación de regiones ITS

Para caracterizar molecularmente las cepas obtenidas, fueron utilizados los barcodes universales ITS, y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvieron amplicones de aproximadamente 600 pares de bases (Figura 13) con una ligera diferencia entre sus tamaños en un gel de agarosa al 0,8% entre los diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*.

Figura 13

Amplicones de las regiones ITS de los aislados de *Beauveria bassiana*



Nota: Carril 1: Ladder 1.5k Plus Opti-DNA (OBM), carril 2: control negativo; carril 3: B-102JM; carril 4: BC-101JM; carril 5: C1-100JM; carril 6: C2-100JM; carril 7: C3-100JM

Secuenciación

Se obtuvieron diferentes longitudes de secuencia para cada una de las muestras que van desde 490 pb para C3-100JM a 537 pb para B-102JM con una concentración de 1090 ng/uL y 410 ng/uL respectivamente. Para el análisis de identidad de las secuencias obtenida de los fragmentos ITS en primera instancia se empleó el software informático Mega 7 para la limpieza de las regiones que presentaron una baja calidad de secuenciación, realizando su comparación con secuencias homologas con la herramienta informática BLAST (

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) obteniendo un porcentaje de similitud y número de acción en el Genbank para cada una de las muestras detalladas en la tabla 5.

Tabla 5

Detalles del porcentaje de identidad y número de acción en el Genbank de secuencias homologas.

Código de Muestra	Concentración	Longitud	% de Calidad	Organismo	% de Identidad	Nº de Accesión
B-102 JM	410 ng/uL 260/280: 1.9 260/230: 2.13	537 pb	100	<i>Beauveria bassiana</i>	100	MN1224 13.1
BC-101JM	688.3 ng/uL 260/280: 1.89 260/230: 2.06	535 pb	100	<i>Beauveria bassiana</i>	100	MN1224 13.1
C1-100JM	1634.7 ng/uL 260/280: 1.94 260/230: 2.36	500 pb	90.2	<i>Beauveria bassiana</i>	99.8	MT6350 20.1
C2-100JM	5258.3 ng/uL 260/280: 2.06 260/230: 2.16	540 pb	100	<i>Beauveria bassiana</i>	100	MN1224 13.1

C3-100JM	1090 ng/uL	490 pb	95.5	<i>Beauveria</i>	99.39	MT6350
	260/280: 1.88			<i>bassiana</i>		20.1
	260/230: 2.04					

Nota: ng: Nanogramos; uL: Microlitro; pb: Pares de base

En el alineamiento de las secuencias moleculares de los distintos aislados como se observa en la figura 14, se empleó el software informático T-COFFEE como se observa en la figura 14, se empleó el software informático T-COFFEE obteniéndose un valor de consistencia de alineamiento de 973 donde se pudo determinar que en el aislado C3-100 JM (M396) presenta una mutación en su secuencia distinta al resto de aislamientos, siendo estos los nucleótidos timina y adenina.

Figura 14.

Alineamiento múltiple de las secuencias moleculares de los aislamientos frente a distintas secuencias ITS del género *Beauveria* spp.

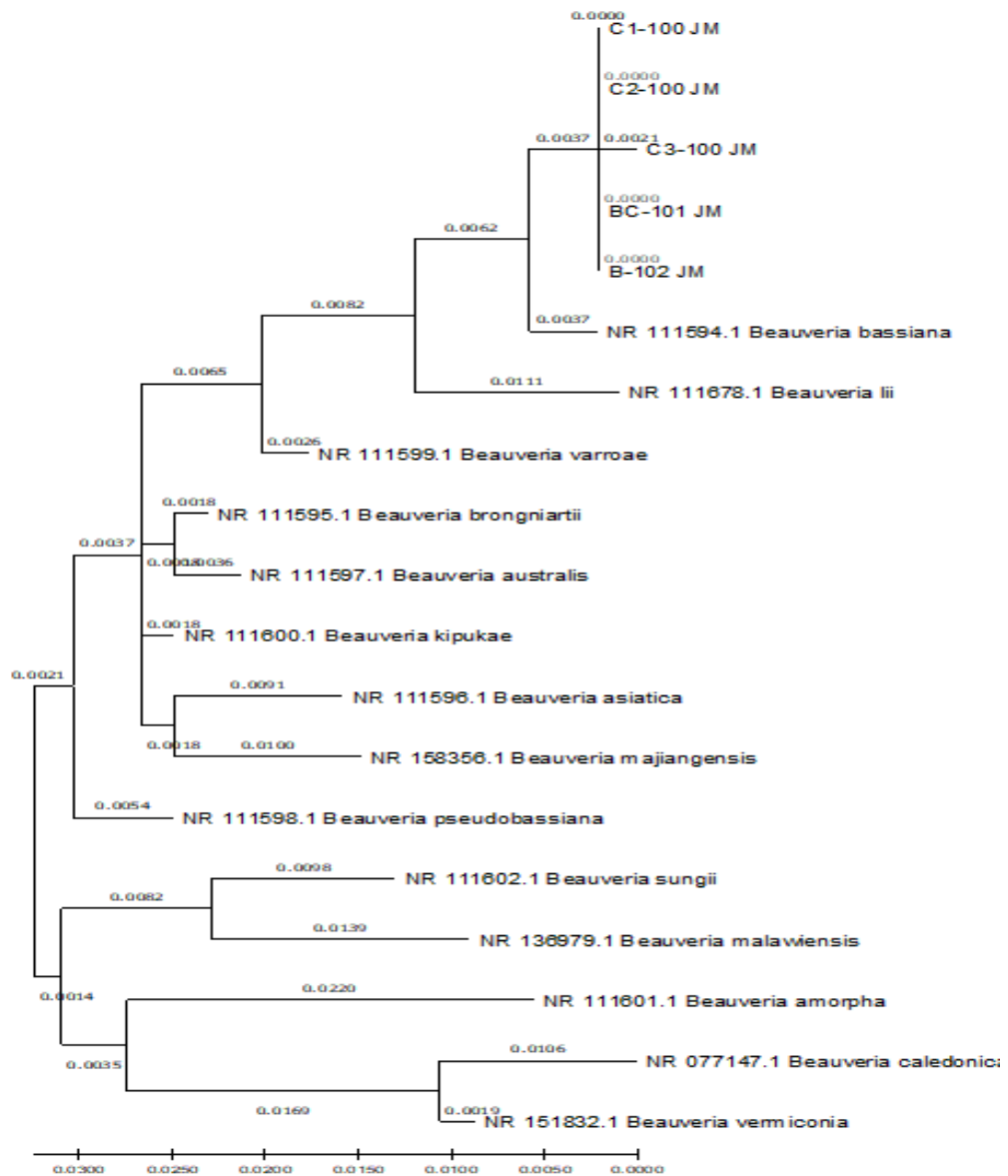


Nota: Recuperado del Software informático T-COFFEE

Árbol filogenético

Figura 15

Árbol filogenético de las secuencias moleculares de los distintos aislados de *Beauveria bassiana*



Nota: Árbol filogenético de las secuencias de los diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* y secuencias obtenidas de las bases de datos de NCBI, realizado mediante el método Neighbor-joinig

Después de analizar las secuencias moleculares y realizar un alineamiento con los distintos ITS (Internal transcribed spacer) del género *Beauveria spp*, se logró determinar que los cinco aislados corresponden al género *Beauveria bassiana*, aunque no se localizan en el mismo clúster sin embargo están a una distancia filogenética cercana. Lo que nos permite concluir que pertenecen al mismo género.

Determinando que el aislado C3-100 JM presenta una distancia evolutiva de 0,0021 distinta al resto de aislamientos, por lo que en los análisis moleculares de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) permiten identificar divergencias genéticas como lo reportado por Viviana Becerra et al (2006) en el uso de ITS para determinar variabilidad en *Beauveria bassiana*, en la que se presenta una limitante en cuanto a la capacidad de discriminación entre ellos debido a que comparten un mismo haplotipo.

Caracterización morfológica de *Cosmopolites sordidus*

Se logro visualizar en un estereomicroscopio a un objetivo de 4x que los insectos adultos recolectados (Ver anexos) presentaron un color negro brillante que en la región del tórax y abdomen se encontraba cubierta de pequeños poros, con una cabeza pequeña y alargada que en su extremo superior presento un pico de una longitud proporcional al tamaño de la cabeza, con un par de antenas con una conformación clavadas acodadas y cortas.

El tórax presento una forma ovalada que en su parte superior esta recubierta por pequeños poros, mientras que sus alas se encuentran ubicadas sobre la región del abdomen y por debajo del élitro que presenta líneas longitudinales, estas alas se encuentran cubiertas por una venación sencilla de forma lateral sin manifestar ramificaciones. Se conto un total de 3 pares de patas distribuidas en la región del tórax y protórax. El abdomen consta de placas ventrales, que en la parte del dorso se localizan siete tergitos que se curvan hacia el final del abdomen, todos los especímenes tenían una longitud promedio de 10 mm desde su pico hasta la región terminal del abdomen. Coincidiendo estos rasgos descritos con los señalados por Luis

Fernando-Vallejo et al (2007); Paula Sepúlveda-Cano et al (2009) en la redescrición de especies adultas de *Cosmopolites Sordidus Germar, 1824* (Coleoptera:Curculionidae).

Bioensayos

Patogenicidad de los diferentes aislados de *Beauveria Bassiana* en *Cosmopolites Sordidus*.

Se registro el número de insectos muertos cada 24 horas durante un periodo de 72 horas, donde se obtuvo un total de insectos muertos siendo detallada en la tabla 7. Los primeros signos de desorientación y perdida de coordinación en su movilidad fueron observables a las 24 horas desde su inicio de inoculación, por lo que podría ser atribuido a los efectos de las micotoxinas tal como lo sugerido por Johnny Huanes Carranza et al (2016) o de igual forma debido a efectos citotóxicos en las líneas celulares ejercidos por los metabolitos tenellin, oosporeína y bassianina (José Guadalupe Ávila-Hernández, 2020). Trascurrido 7 días luego de las 72 horas posteriores a su muerte con una humedad relativa <90% se evidencio la emergencia de micelio, que cubrió los cadáveres de los insectos tal como se observa en la figura 16 como lo descrito por Andy Ronquillo Moran et al (2021) en la que obtuvo un crecimiento de micelio en *Cosmopolite sordidus* a partir de los 8 días evaluando 3 dosis de productos comerciales con base activo de *Beauveria bassiana* en la provincia de Babahoyo-Ecuador. Determinando así que existe una independencia de patogenicidad con respecto al tiempo, tal como lo menciona Haiyang Wang et al (2021) donde las micotoxinas producidas por *Beauveria bassiana* son determinantes para la eliminación de insectos objetivos por ellos estos metabolitos secundarios como beauverolidos, bassinanina, beauvericina, oosperina, tenellin y acido oxálico, varían el mecanismo de patogenicidad.

Tabla 6.

Descripción del número total de insectos muertos del género *Cosmopolites Sordidus* a una concentración de 10^6 espo/mL de *Beauveria Bassiana* en un periodo de tiempo de 72 horas.

Cepa de <i>Beauveria Bassiana</i>	24 horas	48 horas	72 horas
B-102JM	0	2	5
BC-101JM	1	2	4
C1-100JM	0	1	6
C2-100JM	0	0	7
C3-100JM	0	3	4

Nota: efectos bioinsecticida de los distintos aislados de *Beauveria bassiana*

Figura 16

Micosis en insectos del género *Cosmopolite sordidus*



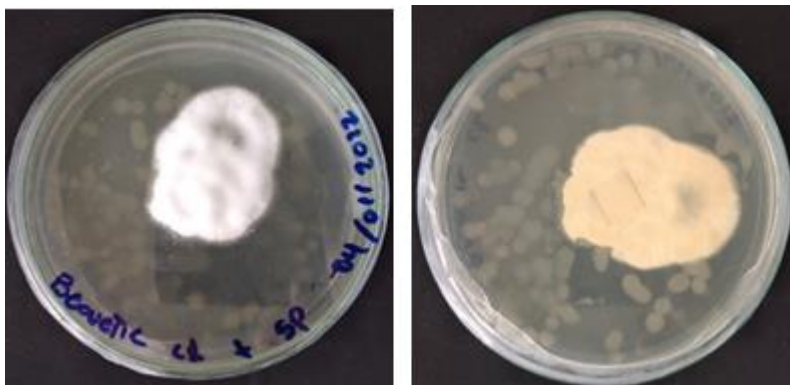
Nota: Aislamiento C3-100 JM de *Beauveria bassiana*

Efectos antibacterianos de los aislados de *Beauveria Bassiana* en el género *Pseudomonas spp.*

Se obtuvo una reducción en cuanto a las unidades formadoras de colonias (UFC) del género *Pseudomonas spp* que fue proporcional al crecimiento de micelio de los diferentes aislados de *Beauveria Bassiana* los cuales presentaron cambios en la pigmentación del medio de cultivo tornándose de un color rojizo más intenso en dichos aislados que se obtuvo una mayor actividad antibacteriana. La muestra C1-100 JM presentó un menor efecto (Figura 17), mientras que BC-101 JM y C3-100 JM se observó en un lapso de tiempo de 10 días una eliminación del 90% de UFC de *Pseudomonas spp* (Figura 18). Las actividades antibacterianas ejercidas por los metabolitos secundarios con efectos antibióticos (Bassianolida, bassianin, bassiacridina y oosporein), han sido caracterizados e identificados cada uno de ellos, por lo que la pigmentación roja en los medios de cultivo se debe al antibiótico oosporeína (Sohair H El Basyouni, 1968).

Figura 17

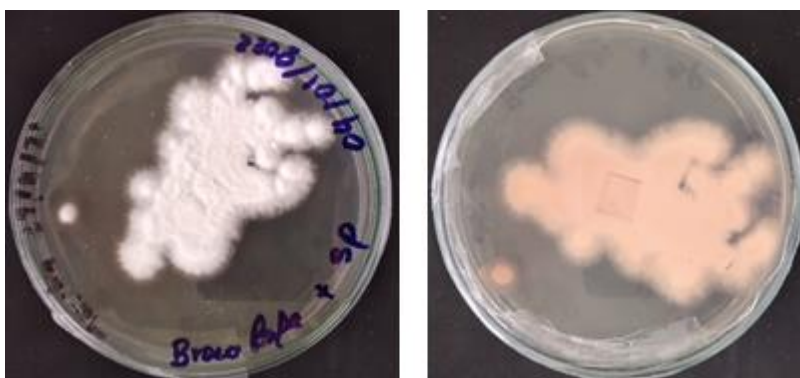
Inhibición del género *Pseudomonas* spp por el aislado C1-100 JM de *Beauveria bassiana*.



Nota: Aislado C1-100 JM en medio de cultivo PDA inoculado con 10^{-5} UFC de *Pseudomonas* spp.

Figura 18

Inhibición del género *Pseudomonas* spp por el aislado BC-102 JM de *Beauveria bassiana*.



Nota: Aislado BC-102JM en medio de cultivo PDA inoculado con 10^{-5} UFC de *Pseudomonas* spp.

Efectos antibacterianos de extractos crudos de *Beauveria Bassiana* en el género *Pseudomonas spp.*

En los diferentes extractos obtenidos del micelio de *Beauveria Bassiana* se obtuvo una coloración amarillenta y rojiza con una ligera sedimentación de color blanco, estos volúmenes obtenidos tuvieron una variación que fueron desde los 3 mL a 5 mL en los micelios de las cepas C1-100JM y Bc-1002JM respectivamente. Se logro obtener una clara evidencia en cuento a la formación de un halo de inhibición (Figura 20) que variaron sus diámetros con respecto a cada uno de los aislado de *Beauveria Bassiana*, detallándose cada uno ellos en la tabla 7.

Tabla 7.

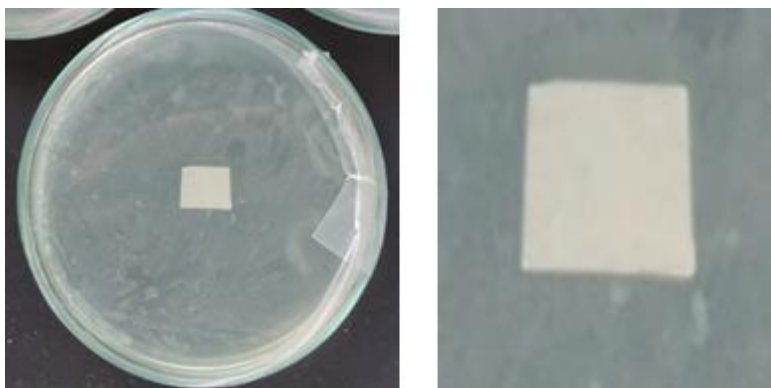
Diámetros del halo de inhibición de los diferentes aislados de *Beauveria Bassiana* con tres repeticiones por cada tratamiento.

Cepas de <i>Beauveria Bassiana</i>	Diámetro del halo de inhibición (cm)		
B-102 JM	1,3	1,2	1,3
BC-101 JM	1,5	1,4	1,5
C1-100 JM	1,1	1	1
C2-100 JM	1,3	1,3	1,2
C3-100 JM	1,3	1,4	1,3

Nota: cm: Centímetros

Figura 19

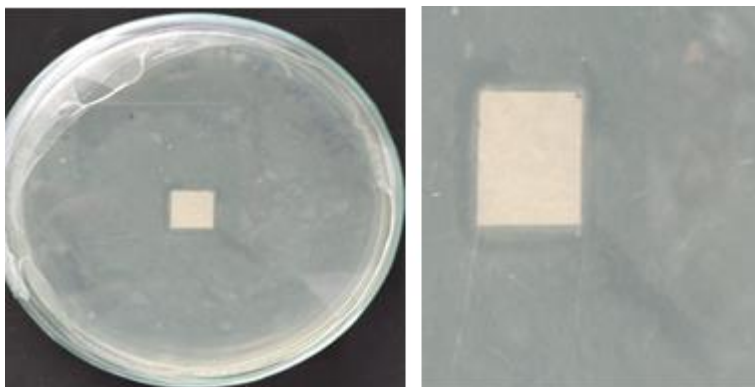
Control negativo en actividad antibacteriana en el género *Pseudomonas* spp



Nota. Agua destilada esterilizada. Medio de cultivo PDA inoculado con 10^5 UFC de *Pseudomonas* spp

Figura 20

Actividad antibacteriana de los extractos BC-102 JM de *Beauveria bassiana*



Nota. Halo de inhibición del extracto crudo del aislamiento BC-102 JM en medio de cultivo PDA inoculado con 10^5 UFC de *Pseudomonas* spp.

Patogenicidad de los diferentes aislados de *Beauveria Bassiana* en *Cosmopolites Sordidus*

Tabla 8

Resultados estadístico descriptivo de Chi-Cuadrado

Estadístico	Valor	Gl	P-Valor
Chi cuadrado Pearson	8,56	8	0,3810
Chi cuadrado MV-G2	9,12	8	0,3319
Coef. Conting. Cramer	0,29		
Coef. Conting. Pearson	0,44		

Nota: Grados de libertad

Considerando que no se observó diferencia estadísticamente significativa con un P-valor de 0,3810 siendo este mayor a nuestra restricción de $P < 0,05$ aceptamos la hipótesis nula y concluimos que la variable patogenicidad de los diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* es independiente del tiempo de inoculación en la que se provoca una muerte a los insectos del género *Cosmopolites sordidus*.

Efectos antibacterianos de extractos crudos de *Beauveria Bassiana* en el género *Pseudomonas spp.*

Tabla 9

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Variable	Número	Media	D.E	W	P-Valor
Halo	15	1,27	0,15	0,89	0,1455

Considerando un valor de P igual a 0,1455 siendo mayor que nuestra restricción de $p < 0,05$ con un 95% de intervalo de confianza se concluye que existe normalidad en la toma de datos para la variable halo de inhibición de los extractos crudos de *Beauveria bassiana*.

Tabla 10Análisis de varianza para Halo de inhibición por *Beauveria bassiana*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
<i>Beauveria bassiana</i>	0,296	4	0,074	22,20	0,0001
Error	0,0333333	10	0,0033333		
Total (Corr)	0,329333	14			

Nota: GI: Grados de libertad; **Total (Corr):** Total Corregido

Considerando que se observa diferencia estadísticamente significativa con un P-valor de 0,0001 siendo este menor a nuestra restricción de $p < 0,05$ con un nivel de confianza del 95% aceptamos la hipótesis alternativa y concluimos que entre la media del Halo de inhibición de al menos un nivel de *Beauveria bassiana* es diferente, por ello se aplicó la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para determinar grupos homogéneos, detallándose en la tabla 13 sus respectivos grupos y media de cada aislamiento.

Tabla 11Pruebas de múltiples rangos para Halo de inhibición por *Beauveria bassiana*

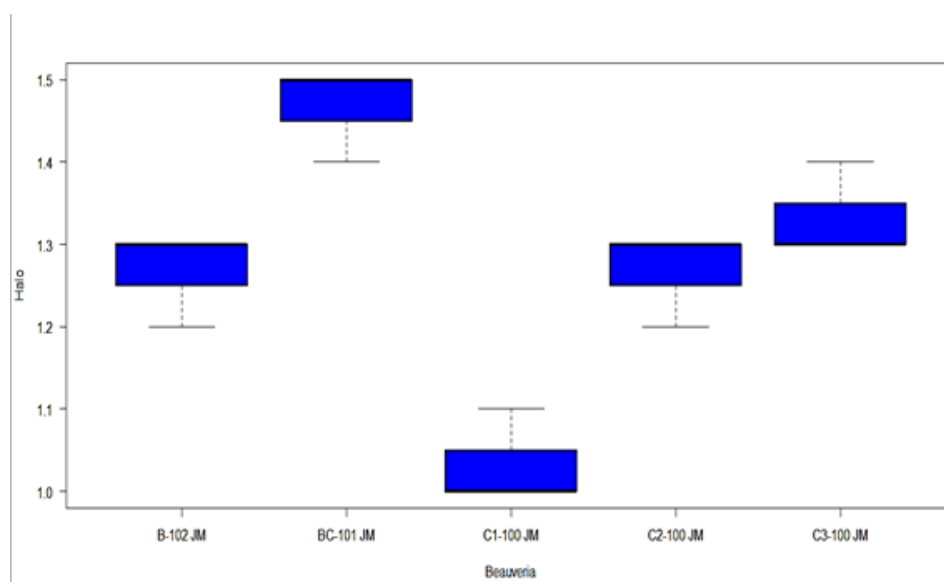
Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
C1-100 JM	3	1,03333	X
B-102 JM	3	1,26667	X
C2-100 JM	3	1,26667	X
C3-100 JM	3	1,33333	XX
BC-101 JM	3	1,46667	X

Se identificaron 3 grupos homogéneos clasificándose de la siguiente forma para C1-100 JM grupa A, B-102 JM y C2-100 JM grupo B, C3-100 JM y BC-101 JM grupo C, con un valor mayor de media en el grupo C. Donde según Jesús M. Villegas-

Mendoza et al (2019) en los extractos crudos de *Beauveria bassiana* a una concentración de 250 ug/mL se logra un porcentaje de inhibición bacteriano del 44% para *Pseudomonas aeruginosa* obteniendo estos resultados bajo un análisis de comparación múltiple. Mientras que Ramesha Alurappa et al (2014) en la caracterización de la bioactividad de la oosporeína para su aplicación en la farmacología y agricultura se obtuvo un porcentaje inhibitorio del 50% para *Pseudomonas aeruginosa*. Siguiendo estos criterios podría considerarse que el extracto crudo obtenido bajo un proceso metanólicos de los aislados BC-102 JM y C3-100 JM presentan una mejor bioactividad de oosporeína para la inhibición del género *Pseudomonas spp.*

Figura 21

Box plot del halo de inhibición de los extractos crudos de *Beauveria bassiana*



Se identifico distintas medias en cuanto al halo de inhibición por efectos de los extractos *Beauveria bassiana* con mayor significancia en la cepa BC-101 JM y C3-100 JM.

Capítulo V

Conclusiones

El aislamiento de *Beauveria bassiana* proveniente de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas presentó una alta actividad antibacteriana para el género *Pseudomonas spp* y bioinsecticidas para *Cosmopolites sordidus* frente a los aislamientos de los productos comerciales Beauvetic y Baussiana, en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25 ± 2 °C en medios de cultivo PDA. Cabe mencionar que en sus características macroscópicas de pigmentación rojiza producida en el medio de cultivo fue comparable con las obtenidas del aislamiento C3-100 JM del producto comercial Beauvetic estableciéndose estadísticamente dentro del mismo grupo que el aislamiento BC-102 JM.

La contaminación presente con *Paecilomyces spp* y *Trichoderma spp* en los aislamientos de los productos comerciales Beauvetic y Beussiana respectivamente, se debe principalmente a otros géneros de hongos empleados como agentes de control biológico que son elaborados y expendidos por las mismas empresas, bajo otras denominaciones, por tal razón se determinó que fue una contaminación cruzada en su propagación, debido a que estos géneros no son empleados en el laboratorio donde se desarrolló la investigación.

En las pruebas de patogenicidad para el género *Cosmopolites sordidus* se observaron resultados bioinsecticidas similares en todos los aislamientos de *Beauveria bassiana* en un lapso de tiempo de 72 horas, con un mayor rango de control biológico a las 48 horas en los aislamientos B-1002 JM, BC-101 JM y C3-100 JM. Por lo que podemos concluir que esto se debe principalmente a la toxicosis producida por cada uno de los aislamientos, siendo esta patogenicidad independiente del tiempo de inoculación a una concentración de 10^6 esp/mL.

A pesar que el método de microscopía óptica con tinción de azul de lactofenol nos proporciona una identificación de estructuras como hifas y conidios

completamente suficientes para diferenciar cepas del género *Beauveria spp*, debido a que este presenta unas estructuras muy estrechamente relacionadas por lo que debe realizar pruebas moleculares para el establecimiento de su identidad.

Las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) permiten identificar divergencias genéticas para determinar variabilidad en *Beauveria bassiana*, pero presenta una limitante en cuanto a la capacidad de discriminación entre ellos debido a que comparten un mismo haplotipo.

Capítulo VI

Recomendaciones

Se recomienda realizar más pruebas bioquímicas a todos los aislamientos de *Beauveria bassiana* en cuanto a licuefacción y amilasas en diferentes condiciones de temperatura y pH para futuros análisis de determinación para identificar un mejor rango de actividad biológica entre los aislamientos.

Se debe evitar la contaminación cruzada con otras cepas de hongos como *Trichoderma spp* como un factor primordial a la hora de realizar la propagación de *Beauveria bassiana*, por tal razón se recomienda proporcionar un ambiente adecuado, ya que al existir más este género en un mismo medio se da inicio a una competencia por micronutrientes desfavorable para *Beauveria bassiana*.

Se debe realizar el aislamiento de hongos entomopatógenos en condiciones ambientales favorables para su dispersión, por ello se recomienda realizarlo cuando exista precipitaciones lluviosas debido al incremento de la humedad relativa.

Capítulo VII Bibliografía

- Acuña González, P. a. (08 de Mayo de 2007). *Repositorio.una.edu.ni*. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/2015/>
- Ana Martha Cruz-Avalos, M. C.-C. (2016). Aislamiento e identificación molecular de cepas de hongos entomopatógenos con actividad hacia el gusano cogollero del maíz (*spodoptera frugiperda*) (lepidoptera: noctuidae) . *Entomología mexicana*, 6.
- Andy Ronquillo Moran, G. V. (2021). Biological control of the banana weevil *Cosmopolites sordidus* Germar with the Use of several *Beauveria bassiana* strains under laboratory conditions. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 16.
- Arnulfo, M. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p . 9 5 - 1 0 3*, 9.
- Barnes SE, M. D. (1997). The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 101 (6) : 662–666, 5.
- Bassi, A. (1836). Del mal del segno calcinaccio o moscardino.
- Bram Slabbinck, B. D. (2009). Analysis of Plant-Pathogenic *Pseudomonas* Species Using Intelligent Learning Methods: A General Focus on Taxonomy and Fatty Acid Analysis Within the Genus *Pseudomonas*. *Revista mexicana de fitopatología* , 16.
- Cano Enilda, C. M. (2004). En G. F. Carballo Manuel, *Control biológico de plagas agrícolas* (pág. 208). Managua: INPASA.
- Carmen Elena Castillo, L. M. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria Bassiana*, aislada de diferentes insectos en el Trujillo-Venezuela. *ACADEMIA - Trujillo - Venezuela - ISSN 1690-3226*, 7.

- CFN. (8 de Agosto de 2017). *Corporacion Financiera Nacional* . Obtenido de www.cfn.fin.ec%2Fwp-content%2Fuploads%2F2017%2F09%2FFicha-Sectorial-Banano.pdf&usg=AOvVaw2C0Ju_X45rx5-eHFON0GxD
- Clifford S. Gold, J. E. (2003). Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera. *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, 77.*
- CS Gold, G. K. (2004). The effects of banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, damage on highland banana growth, yield and stand duration in Uganda. *Association of Applied Biologists, 7.*
- Dairys García-Perera, R. E.-O.-G. (2019). Susceptibilidad de adultos de *Cosmopolites sordidus* (Germar) a *Heterorhabditis amazonensis* Andaló et al. Cepa HC1. *Revista de Protección Vegetal, 8.*
- David A Baltrus, H. C. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant pathology, 17.*
- Dayamí Borges, A. O. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos . *Redalyc.org, 8.*
- Diana Marcela Vinchira Villarraga, N. M. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Rev. Colomb Biotecnol Vol XXI, 4.*
- Douglas Inglis, M. S. (2001). Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests. *CAB International, 47.*
- Drion G Boucias, J. C. (1991). Attachment of Mycopathogens to Cuticle the Initial Event of Mycoses in Arthropod Hosts. *Springer Science+Business Media , 27.*
- Elizabeth Araujo de Albuquerque Maranhão, E. H. (2009). Hongos entomopatógenos: Importante herramienta para el control de moscas blancas (Homoptera:Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, 34.*

- FAO. (5 de Octubre de 2019). *Banana Market Review 2018*. Obtenido de http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documen
- Gary W.Procop, D. L. (2006). *Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Gilberto Manzo-Sánchez, M. O.-S.-B.-R.-C. (2014). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa sp.*). *Revista Mexicana de fitopatología*, 19.
- Gotz, P. (1986). Encapsulation in Arthropods: Immunity in Invertebrate. Ed. by M. Brebeli.
- Hajek A.E, S. L. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomol* 39:293-322, 31.
- Herbert Torres, A. M. (1993). En *Control Biológico del Gorgojo de los Andes (Premnotrypes spp.) con Beauveria brongniartii*. *Guía de Investigación CIP 8* (pág. 37). Lima,Perù: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- HL. Barnett, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Pub. Co.
- IreneVänninen. (1996). Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100(1), 93-101, 9.
- Jesús M. Villegas-Mendoza, N. M.-G.-M.-A.-C.-C.-S. (2019). Evaluación antimicrobiana de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* contra bacterias patógenas de importancia nosocomial. *Ars Pharmaceutica*, 8.
- Jorge E. Ibarra, M. C.-A.-P.-W.-G. (2006). Los microorganismo en el control biológico de insectos y fitopatógenos . *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 8.
- José Guadalupe Ávila-Hernández, M. L.-I.-Q.-P.-M.-Z. (2020). *Beauveria bassiana* secondary metabolites: a review inside their production systems, biosynthesis, and bioactivities. *Mexican Journal of Biotechnology*, 33.

- Koppenhofer, A. M. (1993). Observations on egg-laying behaviour of the banana weevil, *Cosmopolite Sordidus* (Germar). *Kluwer Academic Publishers. Printed in Belgium*, 6.
- Lillian Bunster, N. J. (1989). Effect of Surface-Active *Pseudomonas* spp. on Leaf Wettability. *Applied And Enviromental Microbiology*, 6.
- Luís Fernando Vallejo-E, R. S.-B.-M. (2007). Redescrición del adulto y descripción de los estados inmaduros de *Cosmopolites Sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae), el picudo negro barrenador del plátano en Colombia . *Museo de Historia Natural*, 15.
- MAG. (18 de Junio de 2020). *Sistema de Información Pública Agropecuaria*. Obtenido de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/platano>
- Manual Hernández Velázquez, Z. C. (2011). Aislamientos de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera:Melolonthidae) en agrosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 27(3):591-599, 9.
- María Elena Estrada, M. R. (2004). Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. *Revista Iberoamericana de Micología*; 21: 42-43, 2.
- Marusia Stefanova, P. I. (2009). Optimización de la recuperación de *Pseudomonas syringae* pv. tabaci por la modificación de dos medios de cultivo. *Tropical Plant Pathology*, 4.
- Micaela Pucheta Díaz, A. F. (2006). Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos . *Interciencia* , 6.
- Michael J Bidochka, J. E. (1998). Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany*, 76: 1198–1204, 7.
- Moznette, G. F. (1920). Banana Root-Borer. *Journal of Agricultural Research*, 16.

- Nicolaza Pariona, P. C. (2007). Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). *Rev. peru. biol.* 14(2): 253-257, 6.
- Ostmark, H. E. (1974). Economic insect pests of bananas. *Annualreviews*, 16.
- Paula A. Sepúlveda-Cano, J. D.-G. (2009). Especies de Dryophthrinae (Coleoptera: Curculionidae) asociadas a plátano y banano (*Musa* spp) en Colombia . *Acta biol. Colomb.*, Vol. 14 No. 2, 25.
- Peter, K. V. (2009). *Basics of Horticulture*. India: New India Publishing Agency, 297p. ISBN 978-81-89422-55-4.
- Poppy C.S Sephton-Clark, K. V. (2018). Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. *Elsevier*, 41.
- Ramesha Alurappaa, M. R. (2014). Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. *Natural Product Research*, 6.
- Rina Mercedes Bucaram Leverone, N. P. (2016). Valoración de las acciones contaminantes de la producción tecnificada de banano en el cantón Naranjal, provincia del Guayas . *La protección del medio ambiente* , 13.
- Rogério Biaggioni Lopes, M. M.-F. (2011). Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. *Bulletin of Insectology* 64 (2): 201-208, 8.
- Rojas-Gutiérrez René Leopoldo, L.-M. M.-N.-C. (2017). Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). *Jornal of the selva andina research society* , 21.
- Ruiz-Herrera, J. (1991). Biosynthesis of B-glucans in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 73-81, 9.
- Sohair H El Basyouni, D. B. (1968). Pigments of the genus *Beauveria*. *Canadian Journal of Botany*, 8.

- Traore L, G. C. (1996). Développement postembryonnaire du charançon du bananier, *Cosmopolites sordidus*. *Elsevier*, 9.
- Travis R. Glare, A. J. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycol. Res.* 102 (2) : 250–256, 7.
- Travis R. Glare, T. A. (1993). *Beauveria Vermiconia* is a entomopathogenic fungus . *Mycol. Res.* 97 (3), 336-338 , 3.
- Velez A, G. G. (2000). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* , 11.
- Viviana Becerra, M. P. (2006). Rapd e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. *AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)* , 11.
- Wilson-Krugg, J. H.-C. (2016). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. *REBIOL*, 8.
- Zimmerman, E. C. (1968). Rhynchophorinae of Southeastern Polynesia . *Pacific Insects* , 31.