



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE BIOLOGÍA

Caracterización morfológica y fisiológica de *Beauveria sp.* entomopatógeno de *Hypothenemus hampei*

Trabajo de fin de titulación previo
a la obtención del título de Biólogo

AUTORA

Yulia Nathaly Cajas Suárez

DIRECTORA

Jacqueline Rojas Rojas, Ing.

LOJA - ECUADOR

2012

Ingeniera.

Jacqueline Elizabeth Rojas Rojas

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE CARRERA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “Caracterización morfológica y fisiológica de *Beauveria sp.* entomopatógeno de *Hypothenemus hampei*” realizado por el profesional en formación: Yulia Nathaly Cajas Suárez; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, 7 de agosto del 2012

Ing. Jacqueline Rojas Rojas

C.I. 1103527055

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Yulia Nathaly Cajas Suárez declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice. “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

Yulia Cajas Suárez

C.I. 1104719453

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de su autora”

Yulia Nathaly Cajas Suárez

1104719453

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A mi mamá por creer en mí, por darme una carrera para mi futuro, a mi hermana y mis abuelos, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como personal, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y del cariño, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo, y esto sólo es el inicio de todo lo bello e importante que han hecho por mí.

A mis tíos, y mis primos por estar conmigo y apoyarme siempre, a mis tías Gaby, Cecilia, Kathy por consentirme, a todos ustedes los quiero mucho.

A mi amiga y directora de tesis; Jacqueline Rojas una dedicatoria y un agradecimiento muy especial por su comprensión y su ayuda, por creer en mí, por este tiempo de amistad en los cuales hemos compartido muchas cosas; desde lo más profundo y sincero de mi corazón gracias por el apoyo que me ha dado para poder continuar, gracias por acompañarme en los momentos difíciles, por la paciencia, por ser mi amiga y mi maestra, recuerde siempre lo importante que es para mí y cuanto le quiero.

A mis amigos Natalia, Karina, Ghina, Lucía, Natacha, Tatiana, Mariuxi, Alex y Pablo, muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo, gracias por haberme apoyado en la realización de esta tesis, por su colaboración y sobre todo, gracias por ser mis amigos; recuerden que siempre les llevaré en mi corazón.

Finalmente, sólo puedo decir que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, les dedico este trabajo con el más sincero de los cariños y les agradezco el haber llegado a mi vida y el compartir esos momentos que nos enseñan a crecer y valorar a las personas que nos rodean.

Yulia Nathaly Cajas Suárez

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mi mamá, mi hermana y mi familia por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis que representa ser la continuación de su amor, amistad, motivación, perseverancia y lucha de mis sueños, de aquellos sueños que supieron inculcar desde el inicio de mi vida, especialmente por su amor fraternal que crece cada día y me enseña a vivir y ser mejor.

A mi amiga y directora de tesis Ing. Jacqueline Rojas, por su apoyo incondicional, por su tiempo y paciencia en la realización de mi tesis, por compartir sus invaluable enseñanzas y conocimientos conmigo, y sobre todo por acompañarme en este valioso e importante paso en mi vida.

Quiero agradecer por la amistad, el compañerismo y lealtad de todos los que tuvimos la oportunidad de formar parte del laboratorio de Sanidad Vegetal, agradecer al CITTE de Servicios Agropecuarios, ahora Departamento de Ciencias Agropecuarias, a todos los becarios que tuve la suerte y la oportunidad de conocer: Karina, Rosita, Tatiana, Katty y Juan Andrés. A los docentes: Dr. Pablo Acosta, Dra. Lucía Guzmán, Dra. Natacha Fierro, Dra. Karina Cañón, Ing. Vinicio Carrión, Dr. Rubén Carrera, Dr. Rodrigo Saa y Dr. Jefferson Lasso, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos/as y compañeros de la universidad, a quienes no menciono individualmente por temor a olvidarme de alguno, quiero agradecerles por su sincera amistad en estos cinco años de estudio, exámenes, viajes, salidas de campo y prácticas, por cada una de las oportunidades en las que pudimos compartir momentos de nuestras vidas, por las experiencias que pienso quedarán marcadas en cada uno de nosotros como parte de los mejores recuerdos de nuestra vida.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ustedes.

Yulia Nathaly Cajas Suárez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	II
ACTA DE DECLARACIÓN Y CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR	III
DECLARACIÓN DE AUTORÍA	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	18
<i>Objetivos Específicos</i>	18
METODOLOGÍA	19
A. ZONA DE MUESTREO	20
B. AISLAMIENTO DE HONGOS	20
C. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	21
I. Aspecto y color del micelio	21
II. Tamaño de células conidiógenas y esporas	21
III. Identificación del hongo	21
D. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA	22
I. Concentración de conidas/ml	22
II. Porcentaje de germinación de conidias	22
III. Crecimiento micelial radial	22
IV. Evaluación de la capacidad biocida de las cepas de <i>Beauveria sp.</i>	23
V. Tasa de infección (esporulación del hongo)	23
VI. Análisis estadístico	23
RESULTADOS	25
A. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS	26
B. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	26
I. Identificación del hongo	26
C. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA	33
I. Concentración de conidias/ml	34
II. Porcentaje de germinación de conidias	35
III. Crecimiento micelial radial	36
IV. Evaluación de la capacidad biocida de las cepas de <i>Beauveria sp.</i>	37
V. Esporulación	38
DISCUSIÓN	41

CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las zonas de estudio	20
Tabla 2. Características macro y microscópicas de los aislados e identificación de las cepas.	27
Tabla 3. Morfotipos de <i>Beauveria bassiana</i> identificados	29
Tabla 4. Diferencias significativas de los 4 grupos de aislados analizados fisiológicamente	34

RESUMEN

En esta investigación se aislaron cepas de *Beauveria sp.*, provenientes de insectos de broca de café colectados en diferentes cantones de la Región Sur del Ecuador; mediante claves taxonómicas se identificó morfológicamente las cepas aisladas como *Beauveria bassiana*. Para la caracterización fisiológica se emplearon tres repeticiones por aislado y se incubaron a 20 °C y 25 °C. La mayor concentración de conidias se registró a 25 °C. El porcentaje de germinación fue evaluado luego de 48 horas de incubación; el crecimiento micelial se evaluó en diámetros perpendiculares después de 7 días de incubación. El análisis estadístico no registró diferencia significativa ($p > 0.05$) en los aislados estudiados; y las pruebas de patogenicidad realizadas con dos concentraciones conidiales diferentes de 1×10^7 y 1×10^6 conidias/ml, registraron mortalidad de los insectos a partir del día 1 y 2 luego de haber realizado la inoculación en los insectos. La identificación de morfotipos de *Beauveria bassiana* demuestra la eficiencia del hongo en cuanto a la capacidad entomocida y la adaptabilidad a diferentes ambientes en la Región Sur del Ecuador.

Palabras Claves: hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, morfotipos, patogenicidad.

SUMMARY

In this study, isolates of *Beauveria sp.*, from coffee berry borer insects collected in different districts of the southern region of Ecuador, using taxonomic keys morphologically identified isolates as *Beauveria bassiana*. For physiological characterization using three replicates per isolate and incubated at 20 °C and 25 °C. The highest concentration of conidia was recorded at 25 °C. The percentage of germination was scored after 48 h of incubation; the mycelial growth was evaluated in perpendicular diameters after 7 days of incubation. Statistical analysis showed no significant difference ($p > 0.05$) in the studied isolates, and pathogenicity tests performed with two different conidial concentrations of 1×10^7 and 1×10^6 conidia / ml, insect mortality occurred from day 1 and 2 after inoculation performed in insects. The identification of morphotypes of *Beauveria bassiana* fungus demonstrates the efficiency of about entomocida capacity and adaptability to different environments in the southern region of Ecuador.

Key words: *Beauveria bassiana*, morphotypes, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

La actividad cafetalera en el Ecuador, enfocado como cadena agroindustrial, durante los últimos años ha constituido una fuente de trabajo para un gran porcentaje de la Población Económicamente Activa del país, se estima que alrededor de 130.000 agricultores cultivan café en sus fincas; el café se produce en 20 de las 22 provincias del país lo cual denota la gran importancia socioeconómica del sector. Esta amplia distribución se presenta porque Ecuador es uno de los 14 países, entre cerca de 70, que tiene producción mixta; es decir, cultiva las especies comerciales arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*), sin embargo hay que tomar en cuenta que en algunas provincias la baja tasa de exportación tiene relación directa con el descenso en el potencial de producción, originado por la decreciente productividad de sus cafetales a causa de la presencia de enfermedades que afectan el desarrollo normal de los mismos. Desde hace algunos años la preocupación respecto a la producción de café se ha centrado en el daño que causa la broca (*Hypothenemus hampei*) al fruto del café, esta situación ha hecho que la Asociación Nacional de Exportadores de Café, ANECAFE, priorizara la implementación de un programa de acción que generara conocimientos aplicables para contrarrestar el efecto de la plaga en los cafetales del país. De esta manera en Ecuador se implementan técnicas de producción, formulación, aplicación y evaluación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de la broca de café, llegando a mejorar la producción de café en los últimos años y controlando la presencia de este insecto en los cafetales (Delgado *et al.*, 2002).

La broca del café *Hypothenemus hampei* Coleóptera: Scolytidae), es un insecto negro similar a un gorgojo de entre 1 a 2 mm de longitud. La hembra se caracteriza por ser más grande que el macho (1,4-1,85 mm) (Cárdenas *et al.*, 2007). La broca afecta todas las variedades de café y a diferentes alturas (Monzón, 2001). En 1901 la broca del café es señalada como plaga en el campo, en la actualidad es la plaga que mayor daño ocasiona al cultivo, ya que ataca directamente el fruto, la hembra adulta busca frutos aptos para ovopositar (Bustillo *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 1994; CENICAFE). El mayor daño causado por la broca es en el estado larval, cuando inicia su

alimentación, destruyéndolas completamente (Bustillo *et al.*, 1998). Debido a ello, se han realizado diferentes esfuerzos para reducir el ataque del insecto, mediante controles culturales, químicos y biológicos, en programas de Manejo Integrado de Plagas. La utilización de *Beauveria bassiana* como controlador biológico ha llevado una gran inversión en investigación y producción en diferentes países, debido a su gran potencial y efectividad para el control de muchas plagas insectiles, como la broca (Montilla *et al.*, 2006, Vélez – Arango *et al.*, 2001).

Los hongos entomopatógenos se han visto vinculados con actividades de control biológico, donde se han realizado múltiples ensayos de patogénesis de *Beauveria sp.*, frente a muchas plagas (Vega *et al.*, 2009). Respecto al control de *H. hampei*, Bustillo y colaboradores (1998) en Colombia, han reportado que a nivel de campo, aspersiones líquidas de 1×10^6 esporas/ml del hongo ocasionan una mortalidad de la broca del café en un 30 % y aislamientos de cepas nativas han evidenciado un alto grado de virulencia de las cepas reportado que la mortalidad del 50 % de las brocas se produce a los 6 días, incluyendo un alto grado de esporulación (CENICAFE).

H. hampei es el insecto plaga de mayor importancia económica en los países productores de café, puede reducir la capacidad de cosecha en más de un 50 % (Camilo *et al.*, 2003). El control biológico con el hongo *Beauveria bassiana* constituye un método promisorio de control, tomando en cuenta que los insectos del orden Coleóptera son conocidos por su susceptibilidad al ataque de entomopatógenos; además, constituye una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos que afectan la salud humana y animal (Bustillo *et al.*, 1998; Montoya y Cárdenas 1994; Cárdenas *et al.*, 2007).

Los hongos entomopatógenos causan una alta mortalidad sobre sus hospederos debido a la elevada generación de esporas (Falconí *et al.*, 2010); y a la adaptabilidad a diferentes ambientes, manteniendo especificidad y capacidad de penetración a través del tegumento del insecto que colonizan. Los hongos entomopatógenos comienzan su infección a través de la cutícula externa del hospedero (Vega *et al.*, 2009). La fase de desarrollo del hongo

inicia con la germinación de la espora en la cutícula del hospedero (adhesión); y, penetración a través de un tubo germinativo (Ownley *et al.*, 2009). Los hongos entomopatógenos están vinculados con actividades de control biológico, donde se han realizado ensayos de patogénesis de *Beauveria sp.* frente a muchas plagas (Vega *et al.*, 2009).

El género *Beauveria* es un entomopatógeno generalista, pertenece a la clase Sordariomycetes, Orden de los Hypocreales; (NCBI, 2012; MycoBank, 2012), ataca a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes (Falconí *et al.*, 2010; Pariona *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2000), incluyendo plagas de importancia agrícola como *Hypothenemus hampei* (broca del café) (Posada *et al.*, 2007). *Beauveria bassiana* es un hongo filamentoso, eucariótico que posee células quitinizadas, y parasita insectos. Fue descrita por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis bassiana*. Un año más tarde, Vuillemin la clasificó en su clase actual (MycoBank, 2012). Ensayos enzimáticos posteriores, determinaron el género como *Beauveria sp.*, y diferenciaron seis especies más (MycoBank, 2012; Ownley *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2009)

El hongo *Beauveria bassiana* ha sido utilizado para controlar plagas en muchas regiones del mundo como estrategia de manejo integrado (Godoy *et al.*, 2007; Pariona *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2000). Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por micelio y esporas generadas por el hongo (Agrios, 1998; Vélez – Arango *et al.*, 2001; Lucero *et al.*, 2004; Pariona *et al.*, 2007; Marmolejo *et al.*, 2008; Godoy *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2000). *Beauveria bassiana* se emplea para atacar a la broca cuando está fuera o dentro del fruto (Monzón, 2001; Montilla *et al.*, 2006; Fürst 2000). Si la broca es atacada por el hongo, muere en el transcurso de 3 a 6 días en altas condiciones de humedad (Posada *et al.*, 2007).

El crecimiento de la colonia de *Beauveria sp.*, sobre medios de cultivo (PDA) inicialmente es algodonosa, luego adquiere un aspecto polvoriento, el color del micelio es blanco, y su crecimiento es de forma irregular, la parte posterior del

cultivo es de color rojizo al centro y amarillento alrededor, la pigmentación en el medio de cultivo se debe a la presencia de Bauvericina, una toxina secretada durante el crecimiento (Pariona *et al.*, 2007; MycoBank, 2012).

Beauveria sp., está conformada por hifas septadas de 2,5 a 25 μm . de diámetro, de donde se forman conidióforos simples, con apariencia de botella (más ancho en el centro que en los extremos), que sostienen los conidios, el raquis tiene una apariencia en zig-zag (Domsch *et al.*, 2007; MycoBank, 2012). Las esporas son esféricas y levemente ovaladas (Domsch *et al.*, 2007) pero indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, son hialinas (Vega *et al.*, 2009; Domsch *et al.*, 2007; MycoBank, 2012)

En presencia de un insecto huésped, el conidio de *Beauveria bassiana* germina y se forma un tubo germinativo que ayuda a la penetración de las hifas en la cutícula del insecto por actividad enzimática extracelular (quitinasas, lipasas, esterases y proteasas), a partir de esto se forma una red de hifas dentro del insecto; el estado de germinación del hongo dentro del insecto es dependiente del estado del insecto y del ambiente externo (Vega *et al.*, 2009; González – García *et al.*, 2001).

Para utilizar hongos entomopatógenos como insecticidas deben producirse cantidades masivas del hongo, el cual debe mantener su capacidad infectiva por un período de tiempo considerable (Ownley *et al.*, 2009), algunas pruebas para comprobar la capacidad de viabilidad del hongo es la germinación de esporas, y la pureza que revela la proporción del agente biológico en la formulación.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y evaluar morfológica, fisiológica y patogénicamente aislados de *Beauveria bassiana* que se obtuvieron a partir de insectos de broca del café, con el fin de seleccionar características que permitan establecer la presencia de morfotipos de *Beauveria bassiana*, en los cultivos de café de la Región Sur del Ecuador.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar y evaluar morfológica, fisiológica y patogénicamente aislados de *Beauveria bassiana* para determinar la presencia de morfotipos en los cultivos de café de la Región Sur del Ecuador.

Objetivos Específicos:

- Aislar e identificar morfológicamente el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, en cultivos de café de la Región Sur del Ecuador.
- Determinar diferencias en las características morfológicas y fisiológicas de los aislados de *Beauveria bassiana*.
- Determinar los tipos de morfotipos de *Beauveria bassiana* en base a las características morfológicas y fisiológicas identificadas en los aislados.
- Evaluar la capacidad patogénica de los aislados de *Beauveria bassiana*

METODOLOGÍA

A. ZONA DE MUESTREO

En el período comprendido entre mayo y julio del 2011 se visitaron 15 fincas cafetaleras con rangos altitudinales comprendidos entre 635 m s.n.m. – 1987 m s.n.m. en diferentes cantones de la Región Sur del Ecuador en las provincias de Loja, Zamora Chinchipe y El Oro, donde no se haya utilizado *Beauveria bassiana* para el control de broca del café. Esta actividad fue desarrollada con el fin de coleccionar individuos adultos de broca donde la presencia de *Beauveria sp.*, haya ocurrido de manera natural.

Tabla 1. Características de las zonas de estudio.

Código	Fincas	Provincia	Cantón	Altitud	Fecha
B 1	2	El Oro	Balsas	635 m s.n.m.	Mayo 2011
B 2				685 m s.n.m.	
P 1	2	Zamora	Pangui	827 m s.n.m.	
P 2		Chinchipe		832 m s.n.m.	
CH 1	4		Chaguarpamba	1053 m s.n.m.	Junio 2011
CH 2				1061 m s.n.m.	
CH 3				1065 m s.n.m.	
CH 4				1069 m s.n.m.	
S 1	4	Loja	Sozoranga	1715 m s.n.m.	
S 2				1727 m s.n.m.	
S 3				1731 m s.n.m.	
S 4				1735 m s.n.m.	
G	1		Gonzanamá	1987 m s.n.m.	Julio 2011
V 1	2		Vilcabamba	1686 m s.n.m.	
V 2				1691 m s.n.m.	
T0	1		Gonzanamá		Enero 2011

B. AISLAMIENTO DE HONGOS

Se obtuvieron 150 individuos adultos de broca de café infectados con *Beauveria sp.* El micelio que se aisló de cada uno de los insectos coleccionados, se sembró en placas Petri con PDA (Potato Dextrosa Agar, Difco Laboratories Detroit, Michigan, EEUU), y se incubó por 15 días a 25 °C hasta su

caracterización (Pariona *et al.*, 2007). Para los individuos sospechosos de micosis se realizaron dos lavados con agua estéril y se colocaron en cámaras húmedas, se incubó a 25 °C de 3 – 5 días. A partir del segundo día en los individuos donde se detectó emersión de micelio se realizaron transferencias del mismo a placas Petri con PDA bajo condiciones asépticas y se incubaron por 15 días a 25 °C.

C. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

I. Aspecto y color del micelio

A partir del segundo día de siembra del hongo en PDA, se realizaron lecturas pasando 1 día, hasta los 15 días donde se registró el aspecto de la colonia (forma, textura superficial y color del micelio), así como pigmentación del medio de cultivo y presencia de exudado en cada una de las cepas aisladas (Ibarra – Aparicio *et al.*, 2005; Pariona *et al.*, 2007; Vélez – Arango *et al.*, 2001). El cambio de color en el medio se determinó en base a la RHS Color Chart.

II. Tamaño de células conidiógenas y esporas

A partir de una colonia de hongos de un cultivo puro y utilizando un asa de platino, se transfirió una pequeña cantidad de micelio a un portaobjetos, y se determinó el tamaño de las células conidiógenas (fiálides y raquis) conforme el método de Kirschner and Piepenbring (2007). Para esta actividad se utilizó el microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Alemania) utilizando un aumento de 100 X. Se evaluaron 20 conidios por aislado y el tamaño se midió en micras (Glare e Inwood 1998; Vélez *et al.* 2001; Pariona *et al.*, 2007; Ibarra – Aparicio *et al.*, 2005; French 1982; Carr *et al.*, 2003).

III. Identificación del hongo:

La identificación de las cepas aisladas se realizó de acuerdo a las características morfológicas y mediante el empleo de la clave taxonómica propuesta por Domsch, Gams y Anderson (2007) citada por Pariona *et al.*, (2007); y, Falconí *et al.*, (2010). También se empleó la clave taxonómica propuesta por Hoog (2000); Brady (1979) y Rehner (2011).

D. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Luego de realizar la caracterización morfológica al azar se seleccionaron 34 muestras identificadas, y se realizó la caracterización fisiológica de las mismas.

I. Concentración de conidas/ml

Luego de realizar cultivos monóspóricos se preparó 10 µL de una solución conidial con una concentración de 10^6 conidas/ml en placas Petri con PDA, diseminándose en toda la superficie del medio con ayuda de un asa metálica estéril. Se realizaron tres repeticiones por cepa aislada y se incubaron a 25 °C y 20 °C durante 15 días (Falconí *et al.*, 2010). Luego se colocó el sustrato con las esporas en 10 ml de agua destilada, se agitó y posteriormente se realizaron diluciones sucesivas con un factor de 0.1. Con una pipeta se tomó una alícuota de la suspensión homogénea de conidas, se colocó en la ranura lateral de la cámara de Neubauer (Nebaüer improved, Marienfeld, Alemania) y se realizaron los conteos de conidas en 5 campos de la cámara para obtener el promedio de esporas por cada cepa de estudio (French *et al.*, 1982; Pariona *et al.*, 2007; Falconí *et al.*, 2010).

II. Porcentaje de germinación de conidas

En placas Petri con medio PDA se depositó una suspensión de conidios de concentración 10^6 con/ml, para un total de 3 repeticiones por morfotipo. Las cajas fueron incubadas de 24 a 48 h, a 25 °C y 20 °C (Pariona *et al.*, 2007; Falconí *et al.*, 2010). Luego de 48 horas de cultivo se evaluó microscópicamente los conidios germinados, y los conteos se realizaron cada 24 horas por dos días, se tomaron 100 conidas y se registró las conidas germinadas. El porcentaje de germinación se determinó en base al número de conidas germinadas / número total de conidas x 100 (Pariona *et al.*, 2007; Vélez – Arango *et al.*, 2001; Ibarra – Aparicio *et al.*, 2005).

III. Crecimiento micelial radial

Luego de obtener cultivos monospóricos utilizando técnicas de diluciones sucesivas (Dhingra y Sinclair, 1995) de las 32 cepas de *Beauveria bassiana*, seleccionadas se sembraron discos de agar de 5 mm de diámetro con micelio

en placas Petri con medio de cultivo PDA y se realizaron tres repeticiones por cepa a 20 °C y 25 °C (Carr *et al.*, 2003). Al segundo día de haber realizado la siembra se efectuaron mediciones en diámetros perpendiculares por placa durante 5 días, con lo cual se determinó la tasa de crecimiento por cepa.

IV. Evaluación de la capacidad biocida de las cepas de *Beauveria sp.*

Para el desarrollo de las pruebas de patogenicidad en el laboratorio, se utilizó la metodología propuesta por González (1993), citado por Lucero *et al.*, 2004, con el fin de determinar la variabilidad en la patogenicidad de cada una de las cepas aisladas de *Beauveria bassiana*, para cada aislamiento se preparó una solución de 10^7 conidias/ml y 10^6 conidias/ml (Montilla *et al.*, 2006; Pariona *et al.*, 2007; González – García *et al.*, 2001) y para cada aislado se emplearon tres repeticiones con 5 diabróticas. Para la inoculación los insectos vivos permanecieron sumergidos durante 20 segundos en la suspensión del inóculo (Lucero *et al.*, 2004; Pariona *et al.*, 2007), luego éstos se colocaron en cajas de plástico, para mantener la humedad en la caja se ubicó un pedazo de papel húmedo generando las condiciones adecuadas de humedad para el desarrollo del hongo (Molina J y Espinal J, 2000). Las evaluaciones fueron diarias para registrar la mortalidad de los insectos. Los cadáveres fueron separados y colocados en cámaras húmedas.

V. Tasa de infección (esporulación del hongo)

Para evaluar la tasa de esporulación de cada cepa de *Beauveria bassiana* aislada se seleccionaron los insectos muertos, se lavaron con agua destilada estéril 3 veces y luego se colocaron en cámara húmeda para facilitar el crecimiento del micelio (Pariona *et al.*, 2007; Falconí *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2009) cada 24 horas con la ayuda de un estereoscopio se observó y registró la presencia de micelio en el insecto. Seguidamente se verificó si se trataba de la misma cepa aislada del insecto de *Hypothenemus hampei*, para ello se observó las estructuras del hongo al microscopio.

VI. Análisis estadístico

Con las características morfológicas se realizó un cladograma por medio del programa estadístico SPSS 15.0 para Windows. En el caso de la caracterización fisiológica como tasa de mortalidad, esporulación y porcentaje de germinación los datos obtenidos se transformaron a $\sqrt{y/100}$, con el fin de homogenizar las varianzas (Pariona *et al.*, 2007; Vázquez L, 2002; Trujillo *et al.*, 2000), para luego ser procesados mediante ANOVA igual que los resultados de recuento de conidias y crecimiento micelial. Las diferencias entre las medias fueron analizadas por medio de ANOVA con un grado de significancia de $P < 0.05$, en el lenguaje estadístico R 2.11.

RESULTADOS

A. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

Se realizaron 150 aislados de hongos, a partir de *H. hampei* provenientes de algunos cantones de las provincias de Loja, Zamora Chinchipe y El Oro. La infección fúngica por este hongo entomopatógeno en los insectos colectados fue alta debido a la cantidad de aislados puros que se obtuvieron, lo que permitió remarcar la presencia natural de hongos entomopatógenos y la factibilidad de obtener cepas fúngicas puras a partir de insectos.

B. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Debido a la alta similitud en el color del micelio y tamaño de las células conidiógenas, esporas y raquis de los 150 aislados, éstos fueron agrupados según el sitio de procedencia de las muestras en 15 cepas cada una conformada por 10 aislados. En la Tabla 2 se muestran los códigos empleados para la descripción de las cepas y de los aislados; así como también la descripción de las características macro y microscópicas de las cepas que se obtuvieron al aislar el micelio de los insectos colectados. También en la tabla se incluye el grupo testigo identificado como cepa T0.

I. Identificación del hongo

La identificación de las cepas se realizó en base a la clave taxonómica de Domsch *et al.* (2007); Hoog (2000); Brady (1979) y Rehner (2011). En la Tabla 2 se muestran los resultados de la identificación de las cepas, respecto al tamaño de la célula conidiógena, raquis y tamaño de las conidias de cada una de las cepas por sitio de muestreo; en base a esto se determinó la diferencia morfológica de los aislados, estableciendo la presencia de morfotipos de *Beauveria bassiana* en la Región Sur del Ecuador.

Tabla 2. Características macro y microscópicas de los aislados e identificación de las cepas.

CEPA	Lugar de procedencia/ Hospedero	Características macroscópicas	Célula conidiógena	Conidia	Fiálides	Identificación
B1 (B1 1 – B 10)	Provincia El Oro - Cantón Balsas Finca 1 (635 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia blanca de aspecto algodonoso. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,05 - (3,5) - 3,75 μm x 1,3 - (1,7) - 2,0 μm .	Conidias hialinas 1,9 - (2,5) - 2,8 μm x 1,35 - (1,7) - 1,95 μm .	Entre 8,45 - (8,45) - 15,6 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
B2 (B2 1 – B2 10)	Provincia El Oro Cantón Balsas Finca 2 (685 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia blanca algodonoso, a polvoriento. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,15 - (4,15) - 4,55 μm x 1,6 - (2,24) - 2,7 μm .	Conidias hialinas 1,6 - (1,95) - 2,0 μm x 1,1 - (1,2) 1,4 μm .	Entre 10,35 - (12,14) - 13 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
CH1 (CH1 1 – CH1 10)	Provincia Loja - Cantón Chaguarpamba Finca 1 (1053 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso a polvoriento, blanca. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,5 - (4,35) - 4,65 μm x 1,6 - (2,29) - 2,65 μm .	Conidias hialinas globosas 1,25 - (1,77) - 2,0 μm x 1,0 - (1,05) - 1,2 μm .	Entre 11,5 - (12,26) - 13,95 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
CH2 (CH2 1 – CH2 10)	Provincia Loja - Cantón Chaguarpamba Finca 2 (1061 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,05 - (3,5) - 3,75 μm x 1,3 - (1,7) - 2,0 μm .	Conidias hialinas globosas 1,9 - (2,5) - 2,8 μm x 1,35 - (1,7) - 1,95 μm .	Entre 8,45 - (8,45) - 15,6 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
CH3 (CH3 1 – CH3 10)	Provincia Loja - Cantón Chaguarpamba Finca 3 (1065 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,2 - (4,5) 4,7 μm x 1,5 - (1,95) - 2,35 μm .	Conidias hialinas globosas 1,7 - (1,86) - 2,05 μm x 1,0 - (1,05) - 1,5 μm .	Entre 11,4 - (12,14) - 13,1 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>

Resultados

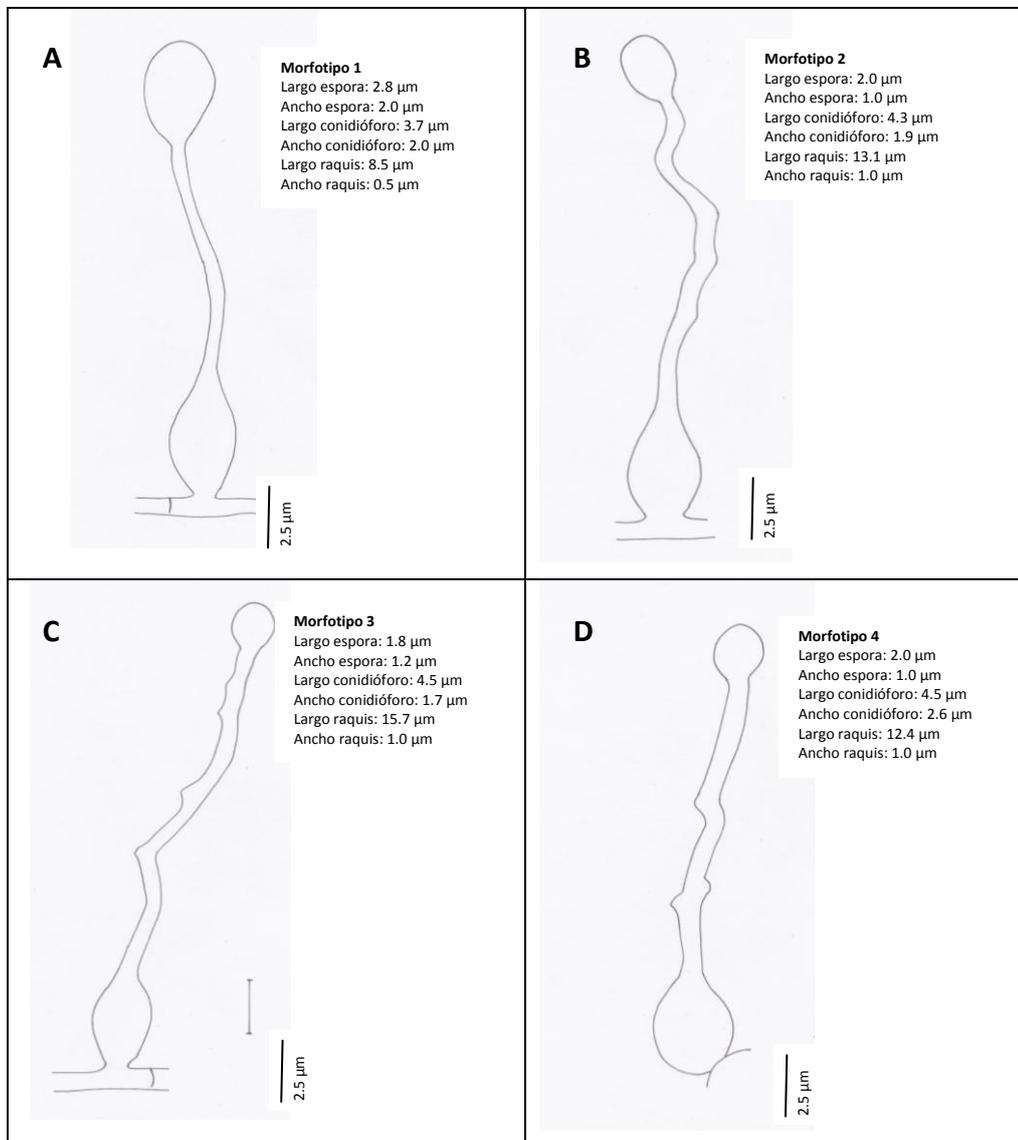
CH4 (CH4 1 - CH4 10)	Provincia Loja - Cantón Chaguarpamba Finca 4 (1069 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,85 - (4,74) - 5,15 μm x 1,7 - (2,02) - 2,45 μm .	Conidias hialinas globosas 1,85 - (1,97) - 2,0 μm x 1,0 - (1,15) - 1,4 μm .	Entre 11,5 - (12,29) - 15,2 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
G1 (G1 1 - G1 10)	Provincia Loja - Cantón Gonzanamá Finca 1 (1987 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,3 - (4,54) - 4,9 μm x 1,85 - (2,25) - 2,5 μm .	Conidias hialinas globosas 1,65 - (1,92) - 2,0 μm x 1,0 - (1,17) - 1,35 μm .	Entre 11,75 - (13,16) - 16,25 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
P1 (P1 1 - P1 10)	Provincia Zamora Chinchipe Cantón Pangui Finca 1 (827 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,2 - (4,44) - 4,95 μm x 1,95 - (2,18) - 2,4 μm .	Conidias hialinas globosas 2,0 - (2,06) - 2,15 μm x 1,0 - (1,07) - 1,2 μm .	Entre 9,55 - (12,8) - 17,05 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
P2 (P2 1 - P2 10)	Provincia Zamora Chinchipe Cantón Pangui Finca 2 (832 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,05 - (3,5) - 3,75 μm x 1,3 - (1,7) - 2,0 μm .	Conidias hialinas globosas 1,9 - (2,5) - 2,8 μm x 1,35 - (1,7) - 1,95 μm .	Entre 8,45 - (8,45) - 15,6 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
S1 (S1 1 - S1 10)	Provincia Loja - Cantón Sozoranga Finca 1 (1715 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia blanca y de aspecto algodonoso a polvoriento. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,05 - (4,37) - 4,8 μm x 1,05 - (1,91) - 2,35 μm .	Conidias hialinas globosas 1,65 - (1,91) - 2,55 μm x 1,0 - (1,11) - 1,5 μm .	Entre 9,1 - (12,16) - 15,65 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
S2 (S2 1 - S2 10)	Provincia Loja - Cantón Sozoranga Finca 2 (1727 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia blanca y de aspecto algodonoso a polvoriento. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 4,2 - (4,48) - 4,95 μm x 1,05 - (1,95) - 2,45 μm .	Conidias hialinas globosas 1,95 - (2,02) - 2,15 μm x 1,0 - (1,05) - 1,25 μm .	Entre 11,1 - (12,38) - 13,45 μm de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
S3 (S3 1 - S3 10)	Provincia Loja Cantón	En PDA colonia blanca y de	Células conidiógenas	Conidias hialinas	Entre 10,75 -	<i>Beauveria bassiana</i>

10)	Sozoranga Finca 3 (1731 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	aspecto algodonoso. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	en forma de botella 4,25 - (4,38) - 4,55 μm x 1,85 - (2,29) - 2,55 μm).	globosas 2,0 - (2,04) - 2,25 μm x 1,0 - (1,12) - 2,0 μm .	(12,17) - 12,95 μm de largo x 1 μm de ancho.	
S4 (S4 1 – S4 10)	Provincia Loja Cantón Sozoranga Finca 4 (1735 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia blanca y de aspecto algodonoso a polvoriento. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 3,7 - (3,98) - 4,35 μm x 1,6 - (2,32) - 2,75 μm .	Conidias hialinas globosas 1,55 - (1,82) - 2,0 μm x 1,0 - (1,13) - 1,6 μm .	Entre 11,35 - (12,65) - 17,2 μm) de largo x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
V1 (V1 1 – V1 10)	Provincia Loja Cantón Loja Finca 1 (1686 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 2,5 - (3,45) - 4,55 μm x 1,3 - (1,55) - 1,65 μm .	Conidias hialinas globosas 2,25 - (2,45) - 2,85 μm x 1,45 - (1,76) - 2,0 μm).	Entre 9,3 - (10,8) - 15,5 μm x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
V2 (V2 1 – V2 10)	Provincia Loja Cantón Loja Finca 2 (1691 m s.n.m.) <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de aspecto algodonoso y blanco. El reverso presenta un color amarillo. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 2,55 - (3,37) - 4,55 μm x 2,6 - (1,73) - 1,25 μm .	Conidias hialinas globosas 2,05 - (2,49) - 2,85 μm x 1,45 - (1,96) - 2,7 μm .	Entre 9,7 - (11,065) - 13,1 μm x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>
T0	Provincia Loja Cantón Quilanga <i>Hypothenemus hampei</i>	En PDA colonia de color blanco con aspecto algodonoso a polvoriento. El reverso presenta un color amarillo pálido. No se registró presencia de exudado.	Células conidiógenas en forma de botella 1,58 - (3,32) - 4,55 μm x 1,38 - (1,62) - 2,6 μm).	Conidias hialinas globosas 2,2 - (2,2) - 2,2 μm x 1,3 - (1,75) - 2,7 μm .	Entre 0,93 - (13,1) - 10,2 μm x 1 μm de ancho.	<i>Beauveria bassiana</i>

En la Tabla 3 se presentan las cepas que conforman cada uno de los morfotipos identificados en base a las características morfológicas; cabe mencionar, que cada morfotipo por la similitud de sus características está constituido por cepas provenientes del mismo sitio de muestreo. La diferencia en las estructuras de los morfotipos identificados se puede observar en la Fig. 1, tomando en cuenta la forma de las estructuras, el tamaño de la espora, célula conidiógena y raquis.

Tabla 3. Morfotipos de *Beauveria bassiana* identificados

MORFOTIPO	CEPAS			
Morfotipo 1	B1	B2		
Morfotipo 2	CH1	CH2	CH3	CH4
Morfotipo 3	P1	P2		
Morfotipo 4	S1	S2	S3	S4
Morfotipo 5	V1	V2		
Morfotipo 6	G1			
Morfotipo 7	T0			



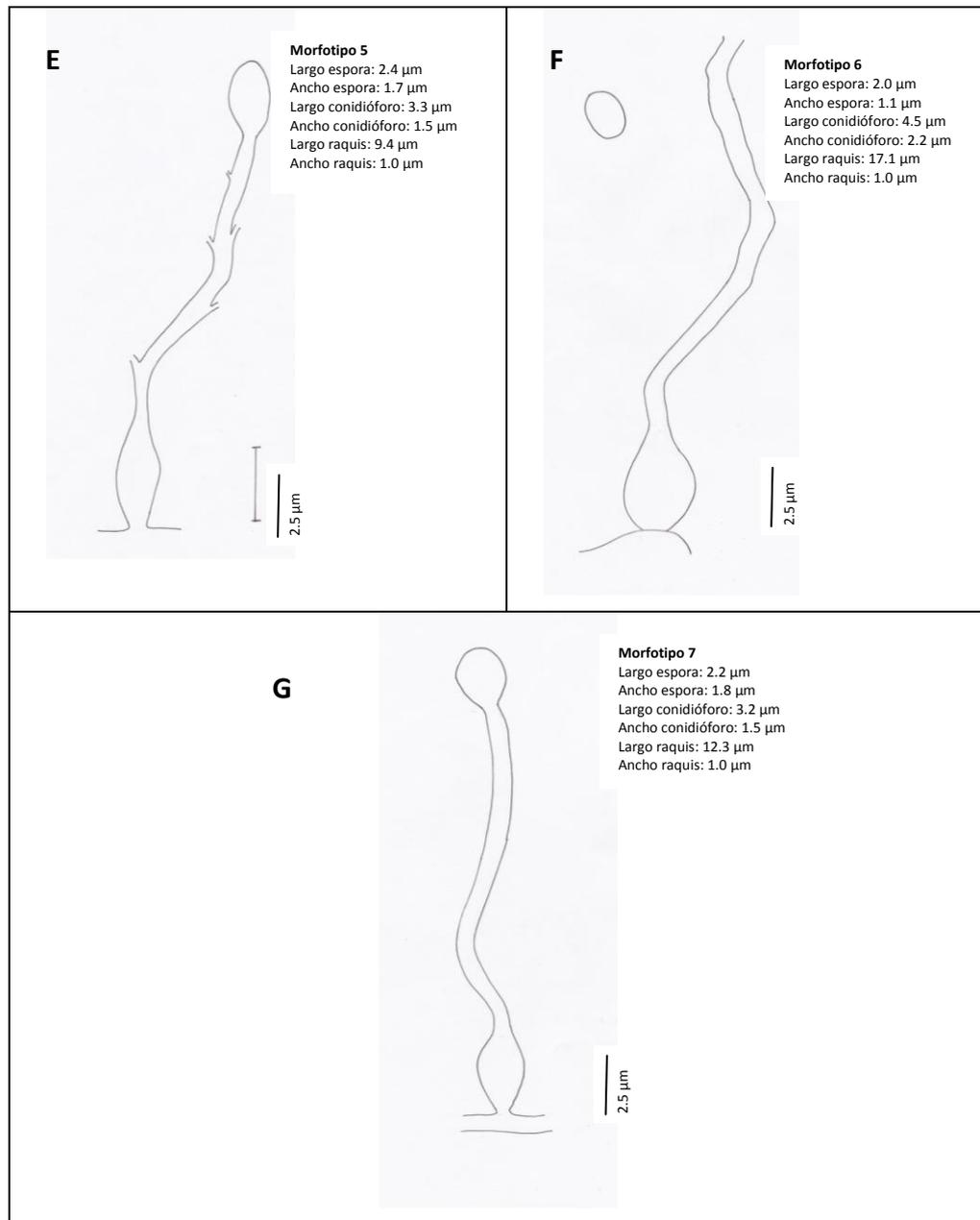


Figura 1. Diferentes morfotipos identificados de *Beauveria bassiana*. (A). Morfotipo 1, Balsas. (B). Morfotipo 2, Chaguarpamba. (C). Morfotipo 3, Pangui. (D) Morfotipo 4, Sozoranga. (E) Morfotipo 5, Vilcabamba. (F) Morfotipo 6, Gonzanamá. (G) Morfotipo 7, Quilanga.

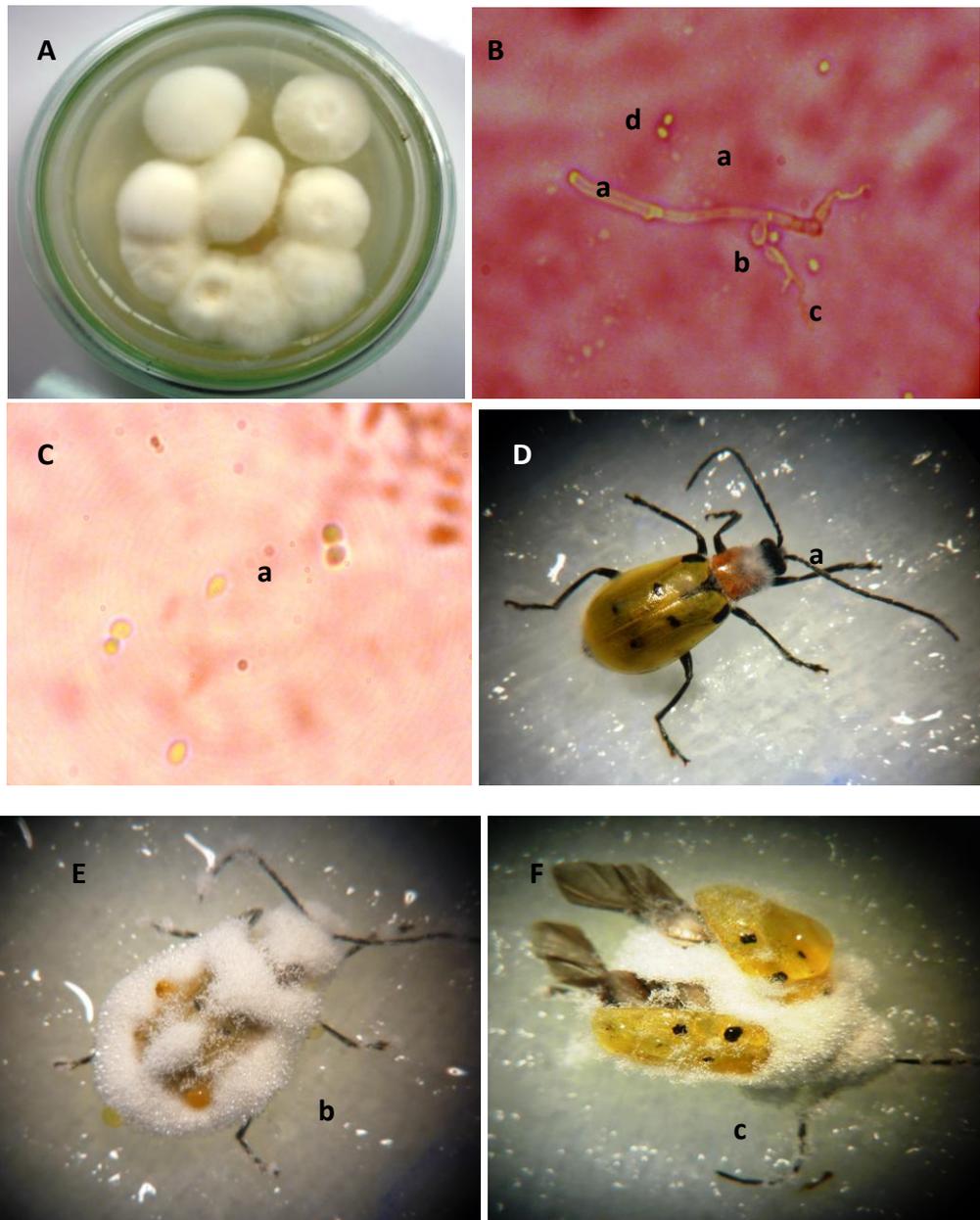


Figura 2. Aislamiento, Caracterización y Patogenicidad de *Beauveria bassiana*. (A). Cepa aislada y purificada de *Beauveria sp.* (B). Estructura microscópica de *Beauveria bassiana*; (a) hifa, (b) célula conidiógena, (c) raquis, (d) conidia. (C). Conidia de *Beauveria bassiana* germinada. (D) Esporulación de *Beauveria bassiana* sobre *Diabrotica sp.* (a) Emersión de micelio, (b), (c) Insectos completamente infectados con *Beauveria bassiana*

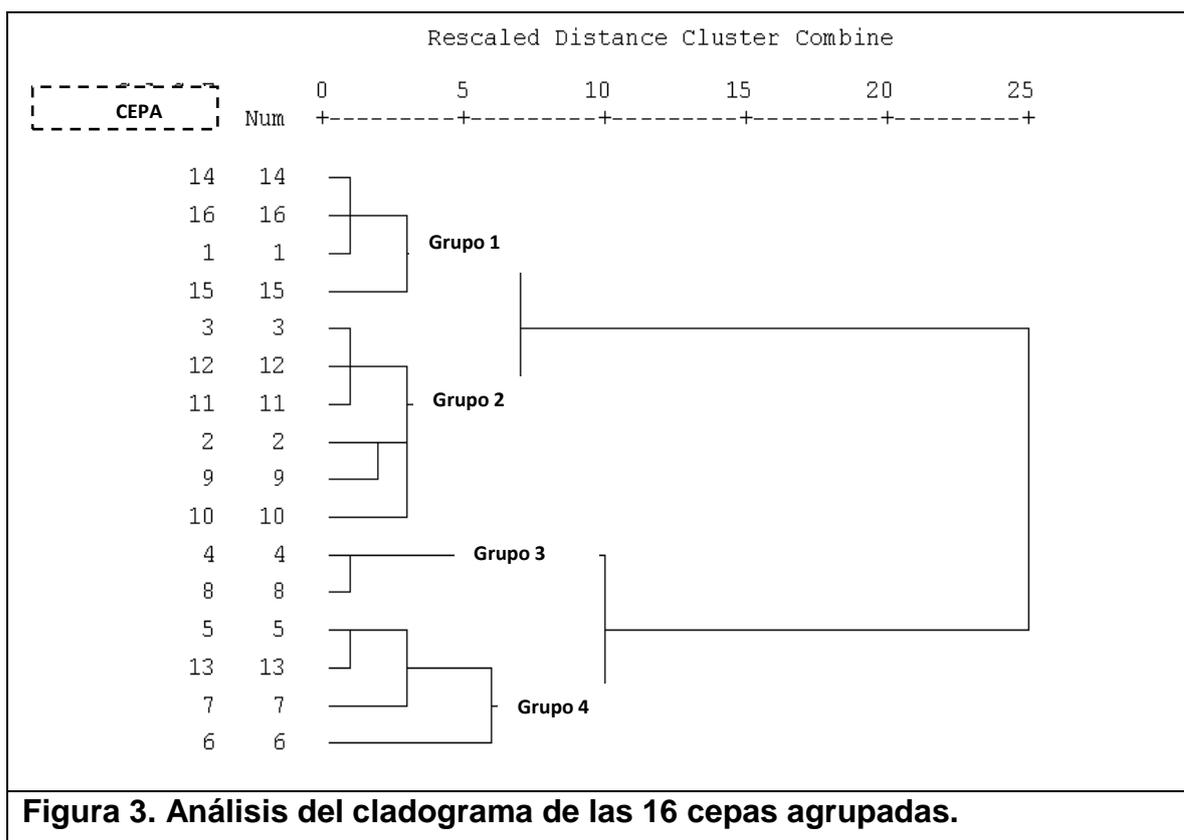


Figura 3. Análisis del cladograma de las 16 cepas agrupadas.

Con el uso del programa estadístico SPSS y con los registros del tamaño de las estructuras pertenecientes a cada cepa se procedió a realizar un cladograma que permitió catalogar los 150 aislados y agruparlos en 16 cepas según el sitio donde fueron colectados (Figura 3). En éstos grupos se seleccionó al azar de 2 a 3 aislados por cepa para realizar ensayos de caracterización fisiológica.

C. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

A partir de la clasificación de las cepas en 4 grupos, se procedió a realizar los ensayos para la caracterización fisiológica de las cepas estudiadas.

Tabla 4. Diferencias significativas de los 4 grupos de aislados analizados fisiológicamente

Prueba fisiológica	Variables evaluadas	P>0.05
Concentración de conidias	Grupo 1~Temperatura	0.916
	Grupo 2~Temperatura	0.948
	Grupo 3~Temperatura	0.975
	Grupo 4~Temperatura	0.932
Crecimiento micelial radial	Grupo 1~Temperatura	0.896
	Grupo 2~Temperatura	0.948
	Grupo 3~Temperatura	0.988
	Grupo 4~Temperatura	1.000
Porcentaje de germinación	Grupo 1~Temperatura	0.786
	Grupo 2~Temperatura	0.799
	Grupo 3~Temperatura	0.809
	Grupo 4~Temperatura	0.783
Mortalidad de insectos	Grupo 1~Concentración	0.989
	Grupo 2~Concentración	0.997
	Grupo 3~Concentración	0.953
	Grupo 4~Concentración	0.970
Esporulación	Grupo 1~Concentración	0.987
	Grupo 2~Concentración	0.977
	Grupo 3~Concentración	0.994
	Grupo 4~Concentración	0.935

I. Concentración de conidias/ml

Las 16 cepas evaluadas presentaron alta producción de conidias luego de 15 días de cultivo con valores mayores a 10^6 conidias/ml, como se indica en la Figura 4 así también se puede observar que la mayor concentración de conidias es a temperatura de 25 °C para los cuatro grupos analizados. El análisis de varianza indica que en los 4 grupos analizados no hubo diferencia estadística significativa ($p>0.05$), referente a la concentración de conidias, demostrando así la adaptabilidad y capacidad de desarrollo de los aislados a diferentes niveles de temperatura.

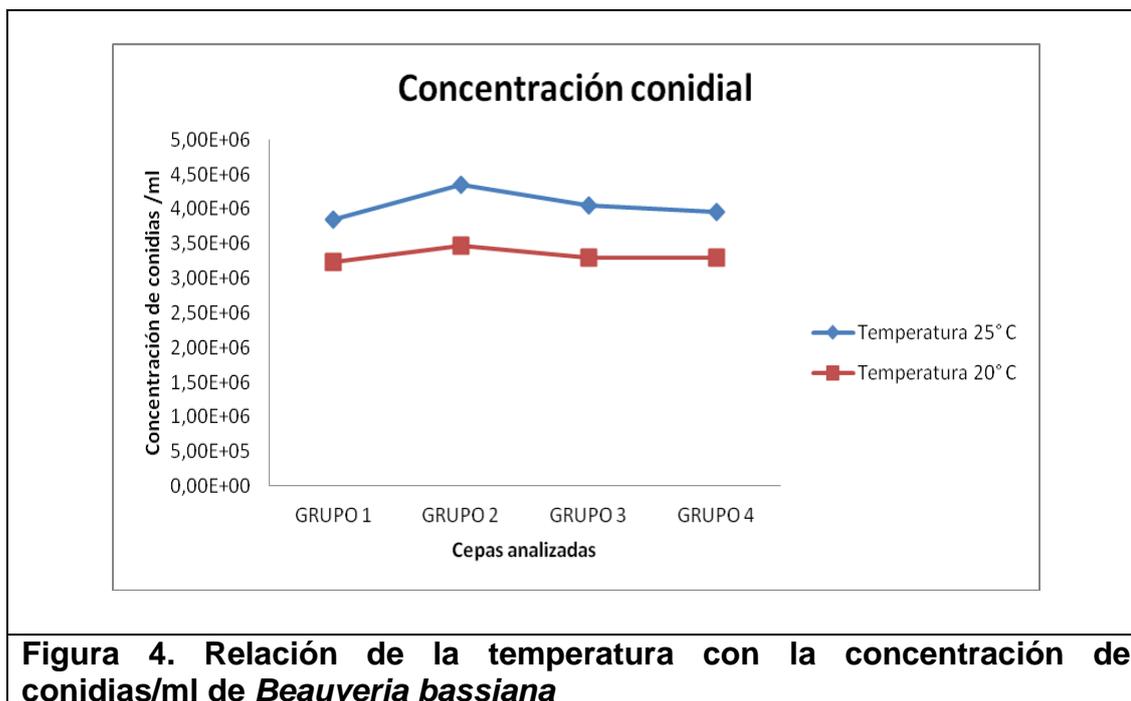


Figura 4. Relación de la temperatura con la concentración de conidias/ml de *Beauveria bassiana*

II. Porcentaje de germinación de conidias

A las 48 horas de haber incubado una suspensión de conidios con concentración de 1×10^6 con/ml en placas Petri, se evaluó microscópicamente los conidios germinados, el análisis de varianza se realizó con el porcentaje de germinación transformado a la función $(\arcsin \sqrt{y}/100)$, para homogenizar las varianzas (Acosta – Quintero *at al.*, 2011). El análisis de varianza en las 16 cepas analizadas indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en la tasa de germinación de las conidias, a 20 °C y a 25 °C como se indica en la Tabla 3. En la Figura 5, se observa como en todos los grupos analizados la tasa de germinación es elevada manteniéndose aproximadamente en un rango de 0.07 cuando la temperatura de incubación es 25 °C, en cambio cuando la temperatura de incubación es 20 °C la tasa de germinación tiende a decrecer manteniéndose en un 0.06.

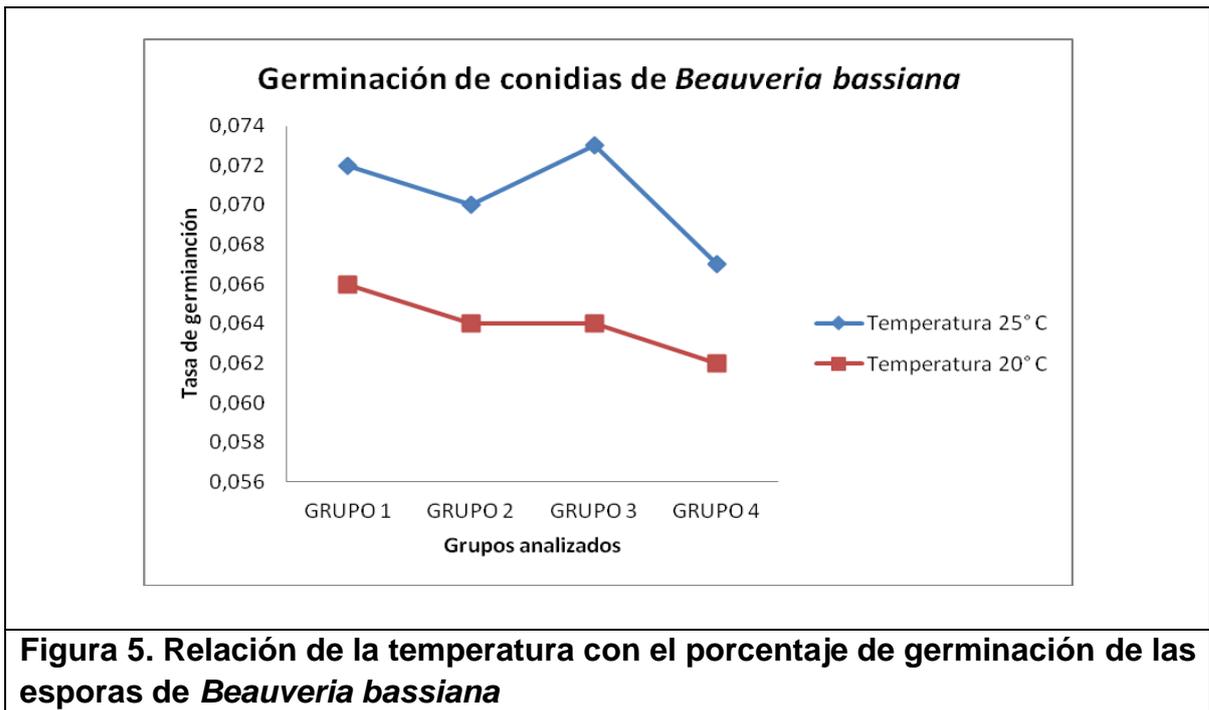


Figura 5. Relación de la temperatura con el porcentaje de germinación de las esporas de *Beauveria bassiana*

III. Crecimiento micelial radial

A los 2 días de haber realizado la siembra en placas Petri, se efectuaron mediciones de crecimiento micelial en diámetros perpendiculares. El análisis de varianza en las 16 cepas indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), a 20 °C como a 25 °C como se indica en la Tabla 3. En la Figura 6, se observa como el crecimiento micelial con dos temperaturas diferentes para los 4 grupos analizados presenta un crecimiento lineal, y en ambos casos el radio de crecimiento alcanzado es superior a 2.5 cm.1

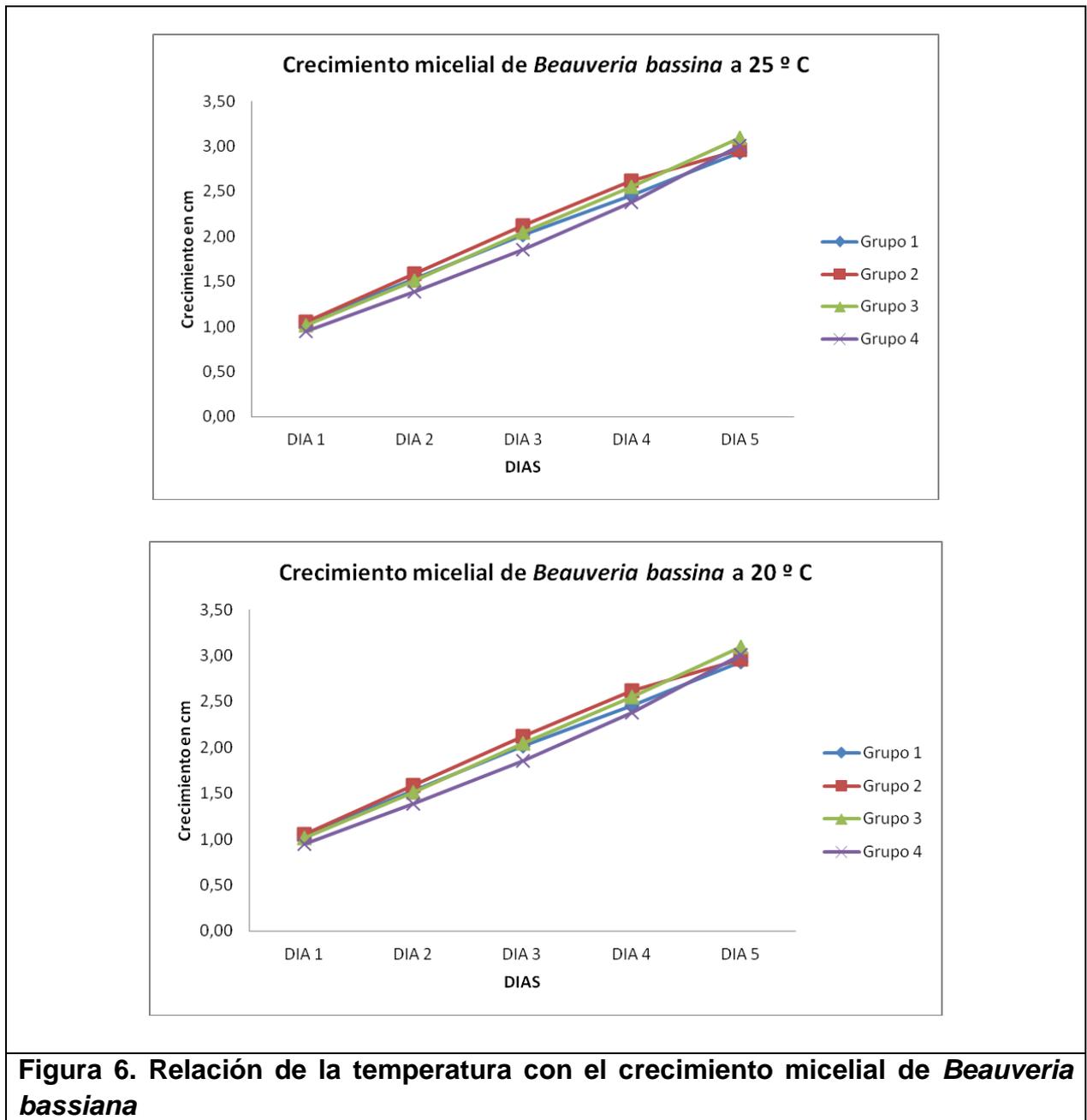
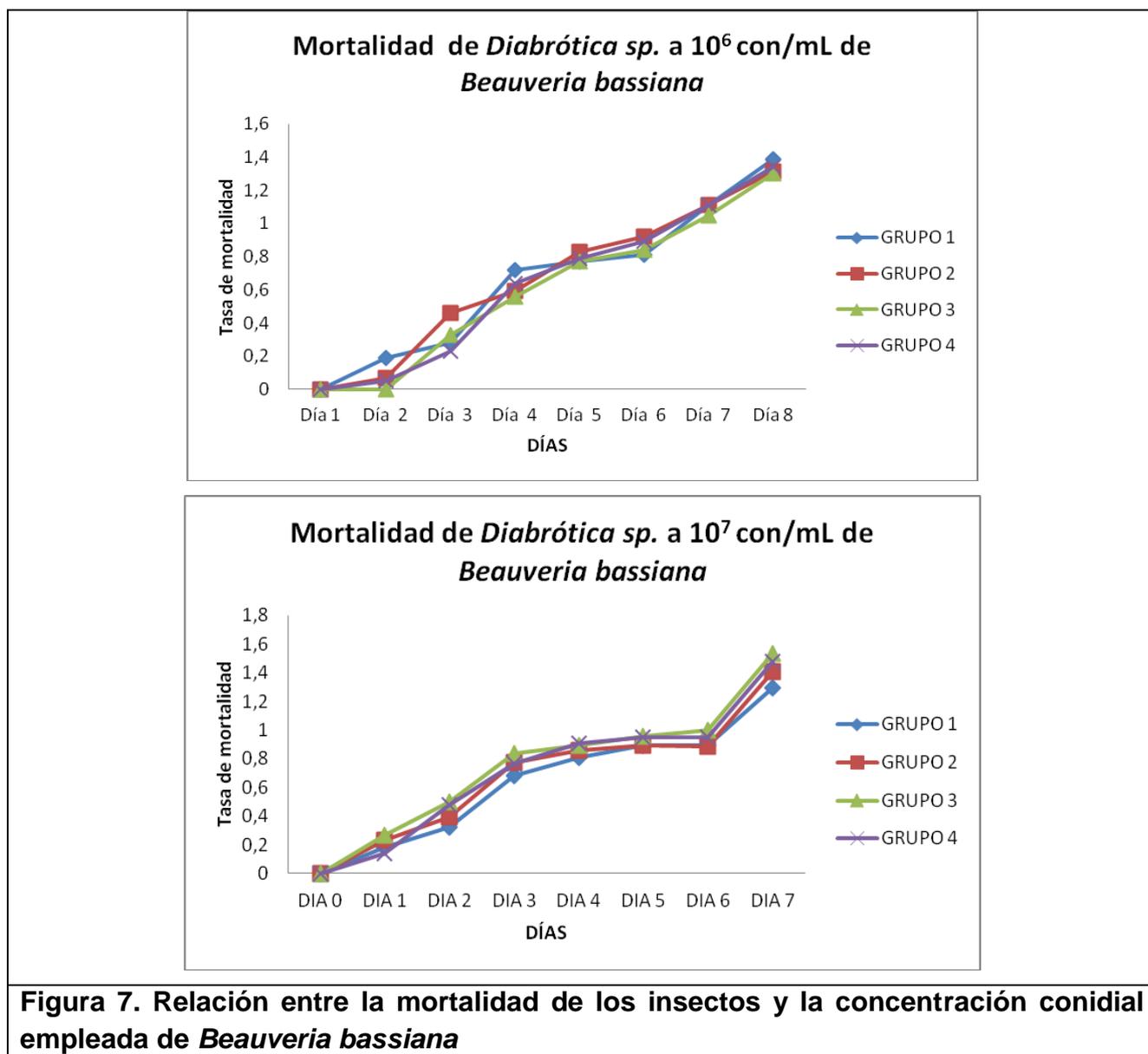


Figura 6. Relación de la temperatura con el crecimiento micelial de *Beauveria bassiana*

IV. Evaluación de la capacidad biocida de las cepas de *Beauveria sp.*

Luego de haber inoculado diabroticas (*Diabrotica spp.*) con dos concentraciones conidiales diferentes y de registrar la mortalidad de los insectos, los datos fueron transformados con la función $(\arcsen\sqrt{y}/100)$ para realizar el análisis de varianza con los datos de mortalidad y concentración empleada, los mismos que no registraron diferencia significativa ($p>0.05$) en ninguno de los grupos analizados, como se indica en la Tabla 3. En la Figura 7 se observa que la mayor tasa de mortalidad es con una concentración conidial

de 1×10^7 con/ml; con un porcentaje de mortalidad del 98.33 % para todos los insectos inoculados hasta el séptimo día de observación. En cambio con una concentración de 1×10^6 con/ml la mayor tasa de mortalidad se alcanza a partir del sexto día, consiguiendo un porcentaje de mortalidad de 86.67 % del total de insectos inoculados para los cuatro grupos evaluados.



V. Esporulación

El porcentaje de esporulación de los 32 aislados evaluados aplicados a insectos adultos de *Diabroticas sp.*, en dos diferentes concentraciones conidiales, estadísticamente no fue diferente ($P > 0.05$) como se indica en la

Tabla 3. En la Figura 8 se observa que la mayor tasa de esporulación es con una concentración conidial de 1×10^7 con/ml con un porcentaje de esporulación del 24 % del total de los insectos inoculados, éste valor se alcanza al sexto día de observación. Y a una concentración conidial de 1×10^6 con/ml la mayor tasa de esporulación se alcanza al séptimo día, destacando el grupo 4 con un porcentaje de esporulación del 12 % de los insectos muertos.

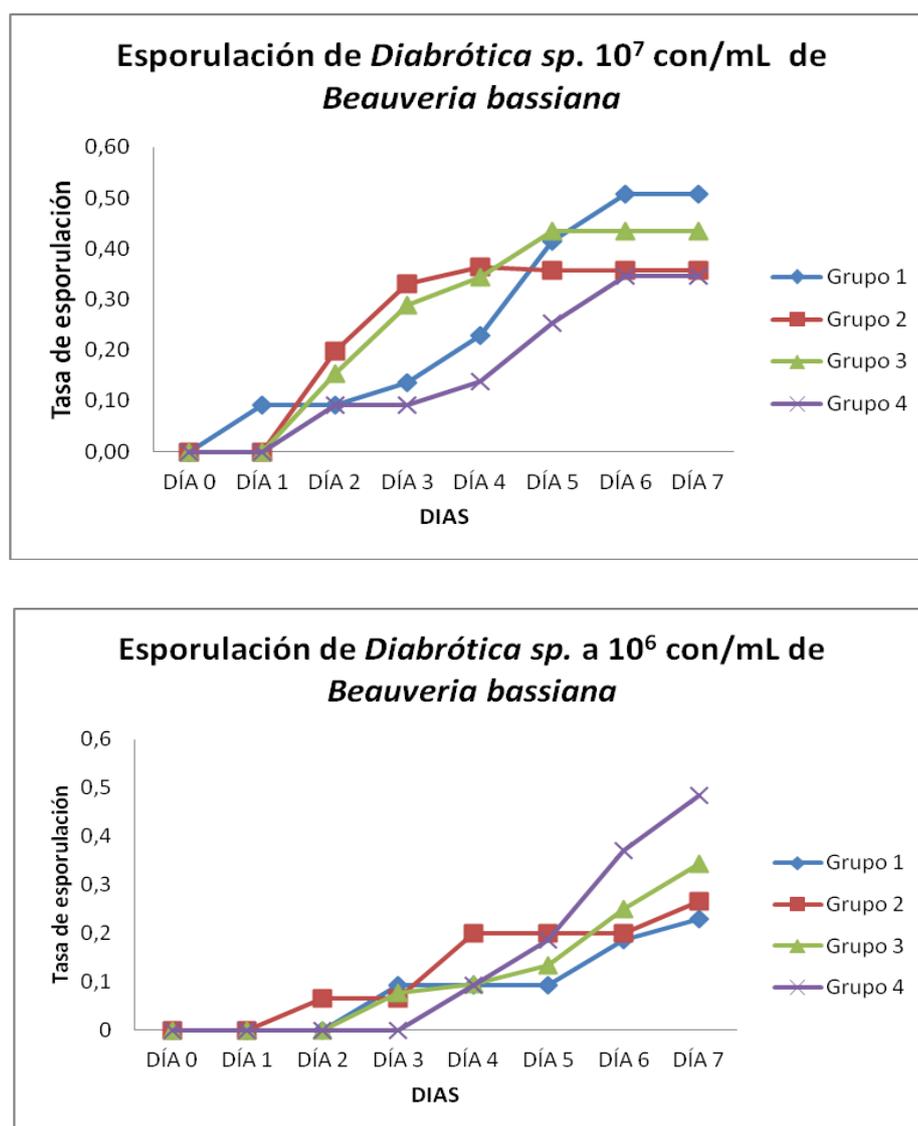


Figura 8. Relación entre concentración del inóculo de *Beauveria bassiana* y esporulación del hongo en el insecto.

La caracterización morfológica y fisiológica permitió establecer la presencia de morfotipos de *Beauveria bassiana* en la Región Sur del Ecuador (Tabla 3); al agrupar las cepas estudiadas en 4 grupos diferentes se analizó el desarrollo de éstos morfotipos en dos diferentes rangos de temperatura presentando altas tasas de desarrollo y patogenicidad al ser inoculados sobre insectos, manifestando así la capacidad de adaptabilidad de las cepas estudiadas.

DISCUSIÓN

Los aislados de *Beauveria sp.*, se obtuvieron a partir de insectos (*Hypothenemus hampei*) infectados de forma natural y alojados en frutos de café provenientes de fincas cafetaleras de la Región Sur del Ecuador. Los aspectos macroscópicos de los aislados como aspecto, color y pigmentación del medio de cultivo de cada cepa, no presentaron variabilidad y no fueron considerados como criterios únicos para determinar la especie de *Beauveria* a la que pertenecían, igual como lo señala Godoy *et al.*, (2007) al evaluar las variaciones morfológicas de *B. bassiana* no se puede considerar éstos criterios como únicos para la caracterización morfológica.

Todos los aislados mantuvieron siempre un aspecto algodonoso y la pigmentación en el medio de cultivo fue amarilla como lo mencionan Pariona *et al.*, (2007) y Elósegui *et al.*, (2006). Sin embargo como el color en el medio no es específico para los tipos de *Beauveria sp.*, existentes, la identificación morfológica por medio del tamaño de las estructuras microscópicas mantiene un peso relevante en el momento de clasificar las especies de hongos, tal como lo sugiere Elósegui *et al.*, (2006); sin embargo determinar las diferencias entre especies de *Beauveria sp.*, siempre ha sido difícil por lo que en base a las claves taxonómicas de Domsch, Hoog, Brady y Rehner se determinó que las conidias de *Beauveria bassiana* son hialinas, lisas y globosas y sus tamaños comprenden desde 1,25 – (1,76)- 2,25 μm de largo, y 1,0 – (1,36) – 2,7 μm de ancho. Los conidióforos son sencillos hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual presenta forma de zig – zag, con tamaño comprendidos entre 2,05 – (3,5)- 4,90 μm de largo, y 1,3 – (2,24) – 2,75 μm de ancho, lo que coincide con las observaciones realizadas por Brady, (1979); Pariona *et al.*, (2007); Carneiro *et al.*, (2008); Falconí *et al.*, (2010) y por Hussein *et al.*, (2010) para la identificación morfológica de *Beauveria sp.*; siguiendo éstos criterios se identificó que los aislados de este estudio corresponden a morfotipos de *Beauveria bassiana*.

En cuanto a la caracterización fisiológica los aislamientos de *Beauveria bassiana* analizados no presentaron diferencias significativas respecto al número de conidias producidas entre las cepas pertenecientes a cada grupo, ni entre las temperaturas evaluadas y como lo afirma Prette *et al.* (2005) y

González – García *et al.*, (2001); esto puede deberse a la baja concentración conidial empleada para evaluar esta característica fisiológica.

Cuando los aislados se colocaron en medio de cultivo PDA para su germinación, ésta fue nula las primeras 24 horas de incubación lo que coincide con las observaciones realizadas por González – García *et al.*, (2001). Además se comprobó que los aislamientos incubados a 25 °C generaron la mayor cantidad de esporas que los incubados a 20 °C; esto se corrobora con otros estudios en los que juega un papel muy importante la concentración del inóculo empleada y la temperatura a la que se incubaron los aislados ya que el desarrollo de *Beauveria bassiana* es afectado por la interacción de factores como temperatura, humedad, hospederos y concentración de la suspensión empleada; nuestros resultados coinciden con los de Godoy *et al.*, (2007) al comprobar que la producción de esporas depende del aislamiento y de la concentración de esporas empleada inicialmente. Sin embargo cabe recalcar que estos aislamientos pueden adoptar un comportamiento diferente en condiciones de campo por lo que la velocidad en la efectividad del hongo depende de la concentración conidial empleada para el inóculo.

Todos los aislamientos de *Beauveria bassiana* estudiadas no presentaron diferencias estadísticas significativas respecto al crecimiento micelial durante los 7 días de evaluación. Algunos hongos tienen crecimiento lineal durante los primeros días de crecimiento *in vitro*, este mismo tipo de comportamiento se observó en el crecimiento micelial de los aislados analizados de *Beauveria bassiana*. Sin embargo igual que los resultados obtenidos por González – García *et al.*, (2001) en los aislados incubados a 25 °C se observó que el crecimiento micelial fue más rápido que los aislados incubados a 20 °C, algunos autores sugieren que las temperaturas óptimas para el crecimiento micelial de *Beauveria bassiana* es entre 25 °C y 30 °C.

Respecto a la patogenicidad se han desarrollado varios trabajos con el fin de seleccionar aislamientos mediante pruebas de laboratorio para el control de insectos plagas, el propósito es seleccionar aislamientos con mayor virulencia,

persistencia y adaptabilidad, de esta manera se espera tener una mayor probabilidad de éxito en campo para controlar plagas (Ownley *et al.*, 2009).

De manera general los aislamientos de *Beauveria bassiana* causaron alta mortalidad sobre adultos de diabroticas. Esta situación coincide con la literatura respecto a la patogenicidad y virulencia de este hongo entomopatógeno sobre insectos plaga, particularmente la susceptibilidad de Coleópteros en estado adulto a esta especie de hongo (Ownley *et al.*, 2009 y Rodríguez *et al.*, 2006).

El porcentaje de mortalidad de los adultos de *Diabroticas sp.*, por efecto de *Beauveria bassiana* varió a partir del segundo día de observación. Estadísticamente no se observó diferencia significativa ($p>0.05$) entre la mortalidad producida y las dos concentraciones empleadas para las 16 cepas analizadas, lo que indica que concentraciones iguales o superiores a las 10^6 con/ml son apropiadas para controlar la mortalidad de insectos plaga, estas observaciones coinciden con Ruiz *et al.* (2009). Para efectos de comparación es preciso mencionar el trabajo de Ibarra – Aparicio *et al.*, 2005, que utilizaron *Beauveria bassiana* en concentraciones de 10^7 con/ml donde tampoco se encontró diferencias estadísticas en los 6 tratamientos empleados y observándose un promedio de 40 % y 37.2 % de mortalidad en el Hemíptero mosca *Aeneolamia sp.*; en nuestro estudio y empleando la misma concentración de *Beauveria bassiana* se encontró un porcentaje de mortalidad del 98.33 % en *Diabroticas spp.*

La alta tasa de mortalidad registrada por *Beauveria bassiana* se ha comprobado en estudios que se debe a la producción de enzimas extracelulares tales como proteasa, lipasa y quitinasa las cuales están involucradas en la penetración de las esporas en el tegumento del hospedante y en consecuencia en la infección de los mismos, esto fue registrado por StLeger *et al.*, (1992) y E Sayed, (1993) mencionados por González – García *et al.*, (2001).

En cuanto a la esporulación como lo menciona Ibarra – Aparicio *et al.*, (2005) los niveles de micosis son variables de una especie a otra y resultados

similares se han encontrado al evaluar diferentes concentraciones de una misma especie de hongo entomopatógeno sobre pulgones de café con rangos de esporulación de 23.1 % al 78 %; en nuestro estudio a una concentración de 10^7 con/ml se registró un porcentaje de esporulación del 24 % en *Diabroticas*. Al igual que Castillo *et al.*, (2009) en los 7 días de observación no se registró esporulación del hongo en ninguno de los insectos que murieron con el grupo control a una concentración conidial de 10^6 con/ml a pesar de tener buenas condiciones de humedad en cada uno de los aislados, pero como lo afirma Falconí *et al.*, (2010) y Pariona *et al.*, (2007), el hecho de no esporular no invalida a las cepas a ser empleadas como bioinsecticidas. Los insectos que mueren por la infección de hongos entomopatógenos esporulan abundantemente en condiciones de alta humedad; sin embargo como lo registró Ibarra – Aparicio *et al.*, (2005) en sus investigaciones la esporulación no siempre puede ocurrir en *Beauveria bassiana*.

CONCLUSIONES

- Se identificó aislados de *Beauveria bassiana* provenientes de insectos de broca del café colectados en algunos cantones de la Región Sur del Ecuador, demostrando así la adaptabilidad y desarrollo de este hongo en diferentes áreas y condiciones climáticas de la Región.
- La caracterización realizada permitió la identificación de morfotipos de *Beauveria bassiana* en la Región Sur del Ecuador a partir de criterios morfológicos, fisiológicos y patogénicos.
- Concentraciones elevadas de inóculo de esporas de *Beauveria bassiana* tienen respuestas rápidas en cuanto al desarrollo y patogenicidad, así como también temperaturas de 25° aseguran un buen desarrollo del hongo.
- La no existencia de diferencias estadísticas respecto al crecimiento micelial, patogenicidad y germinación entre los grupos evaluados resalta la eficiencia del hongo en cuanto a la capacidad entomocida y la adaptabilidad de las cepas del entomopatógeno *Beauveria bassiana* a diferentes temperaturas de prueba, remarcando así la existencia de morfotipos en las cepas colectadas en la Región Sur del Ecuador.
- Se determinó que un crecimiento óptimo de los morfotipos y el mayor porcentaje de desarrollo del hongo es a 25° C en los 4 grupos analizados.
- Los aislados analizados tienen buena capacidad patogénica llegando a matar el 100% de los insectos analizados cuando la concentración conidial fue de 10^7 con/ml, aunque la concentración conidial de 10^6 con/ml también afectó a la mayoría de los insectos analizados la diferencia se estableció con el tiempo de mortalidad de los mismos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda para investigaciones futuras el desarrollo de estudios vinculados con la producción de enzimas como lipasas, proteasas y quitinasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* las cuales están involucradas en la penetración de las esporas en el tegumento del hospedante, con la finalidad de poder conocer más acertadamente el mecanismo de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos.
- Se recomienda también la realización de estudios a nivel molecular del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, sobre todo en los morfotipos encontrados en la Región Sur del Ecuador con el fin de conocer las características específicas que le permite a este hongo tener la capacidad de adaptarse y desarrollarse en diferentes condiciones ambientales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta – Quintero M.E, Cazorla – Perfetti D.J., Eduarte – Pereira G.E., Morales – Moreno P.** (2011). Entomología, D., Tropical, M. & Investigaciones. Patogenicidad dérmica de un aislamiento autóctono del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en ratones. XXI, N° 6, pp. 477 – 483.
- Agrios G.** (1998). Fitopatología., ed. LIMUSA, México, pp. 837.
- Brady B.L.K.** (1979). CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 603. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>
- Bustillo A, Cárdenas D, Villalba P, Benavides J, Posada F.** (1998). CENICAFE. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia., Chinchiná, Colombia. pp. 133
- Camilo J, Olivares F, Jiménez H.** (2003). Agronomía Mesoamericana. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. Universidad de Costa Rica. pp. 59 – 63
- Cárdenas M, Brito R, Giraldo H, Aquino A.** (2007). Entomotropica. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera: Curculionidae) bajo condiciones de campo, en el estado de Táchira, Venezuela. Vol. 22 (2) pp. 49 – 55.
- Carneiro A, Gomes E, Guimarães C, Fernández F, Carneiro N, Cruz I.** (2008). Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria spp.* to fall armyworm. Pesq. Agropec. Brs., Brasília, v.43, n.4, pp. 513 – 520.
- Carr A, Elósegui O, Bel N.** (2003). Fitosanidad Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (WIZE) BROUM & SMITH. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba., vol. 7, núm. 3, septiembre, 2003, pp. 27 – 32.
- Castillo A, Gómez J, Infante F, Vega F.** (2009). Neotropical Entomology Susceptibilidad del parasitoide *Physmatichus coffea* LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) a *Beauveria bassiana* en Condiciones de Laboratorio. Biological Control. 38 (5).
- CENICAFE.** (2012). Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé. Disponible en: <http://www.cenicafe.org/>

- Delgado P, Larco A, García C, Alcívar R, Chilán W, Patiño M.** (2002). Café en Ecuador: Manejo de la Broca del Fruto (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Convenio CFC – OIC - CABI Commodities – ANECAFE.
- Dhingra O, Sinclair J.** (1995). Basic plant pathology methods. Lewis. 2th edition.
- Domsch K, Gams W. and Anderson T.** (2007). Compendium of soil fungi. IHW-Verlag Eching. USA. Second edition.
- Elósegui o, Jiménez J, Carr A.** (2006). Fitosanidad. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga., Vol. 10, núm. 4, diciembre. pp. 265 – 272.
- Falconí F, Flores A, Castellanos P.** (2010). Letalidad de los hongos entomopatógenos sobre *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Revista Peruana de Biología, vol. 17, núm. 2, agosto. pp. 225 – 229.
- French E. and Hebert T.** (1982). Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica.
- Fürst M.** (2000). Control biológico de la broca de café en la producción de café orgánico. Naturland – Asociación para la agricultura orgánica, Kleinhaderner. Alemania.
- Glare, T. R., Inwood, A. J.** (1998). Mycological Research. Morphological and genetic characterization of *Beauveria spp.* from de New Zealand. 102 (2) pp. 250 - 256
- Godoy J, Valera R, Guédez C, Cañizares L, Castillo C.** (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Rev. Fac. Agro. (LUZ). 24 pp. 415 – 425.
- González – García M, Jiménez A, Bustillos A.** (2001). Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. Manejo Integrado de plagas (Costa Rica) N°. 60, pp.. 31 – 35.
- Hoog, G.S.** (2000), Atlas of clinical fungi, ed. 2: pp. 523. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>

- Hussein K, Abdel – Rahman M, Abdel – Mallek A, El – Maraghy S, Joo J.** (2010) African Journal of Biotechnology. Climatic factors interference with the occurrence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in cultivated soil. Vol. 9 (45), pp. 7674 – 7682, 8 November.
- Ibarra- Aparicio G, Moya G, Padilla A.** (2005). Entomológica Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplia* sobre chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (DeLong y Wolcott, 1923) (Hemíptera: Cicadellidae). Folia Mexicana, año/vol. 44, núm 001. pp.. 1-6
- Kirschner R. and Piepenbring M.** (2007). Two new Hyphomycetes parasitic on leaves of *Maianthemum* species in Panama. Mycol Progress. 1557-007-0549-6
- Lucero A, Peña L, Ibarra T.** (2004). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognata scarabaeiodes* (Coleóptera: Scarabaeidae). Revista Corpoica. Vol. 5 N°1. Octubre.
- Marmolejo F, Mejía R, Hurtado I, Posso A, Mauricio J.** (2008). Caracterización molecular de 15 aislamientos de *Beauveria bassiana* asociados con *Cosmopolites* y *Metamasius* en plátano y banano en tres regiones de Colombia. Acta agronómica, vol. 57, núm. 3, octubre, pp. 199 – 204
- Molina J, Espinal J.** (2000). Agronomía Mesoamericana Evaluación de *Beauveria bassiana* para el combate de insectos plaga en maíz almacenado. Año/vol. 11, número 002. Universidad de Costa Rica pp. 15 – 23.
- Montilla R, Camacho B, Quintero A, Cardozo G.** (2006). Parasitismo por *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, en el estado de Trujillo, Venezuela. Agronomía Tropical 56 (2), pp. 183 – 189. 2006
- Montoya S., Cárdenas R.** (1994). Biología de *Hypothenemus hampei* (FERRARI) en frutos del café a diferentes edades. CENICAFE, 45 (1), pp. 5 – 13
- Monzón A.** (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63, pp. 95 - 103.
- Mycobank.** (2012). Fungal Database. Online Taxonomy. Mycological Association. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>

- NCBI Taxonomy.** (2012). National Center for Biotechnology Information. Online Taxonomy. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>
- Ownley B, Gwinn K, Vega F.** (2009). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*. 55, pp. 113 – 128
- Pariona N, Castellanos P, León E.** (2007). Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria sp.* sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). *Rev. Perú. Biol.* 14 (2) pp. 253 – 257.
- Posada F, Aime M, Peterson S, Rehner S, Vega F.** (2007). *Mycological Research*. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research* III. pp. 748 – 757.
- Prette N, Monteiro A, García M, Edesio Soares V.** (2005). Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingugitados de *Rhipicephalus sanguineus*. *Ciencia Rural*, vol. 35, núm. 4, pp. 855 – 861.
- Rehner S, Minnis A, Sung J, Luangsa-ard J, Devotto L, Humber R.** (2011). *Mycologia* 103(5), pp. 1055 – 1073. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>
- Rodríguez M, Gerding M, France A.** (2006). Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE). *Agricultura Técnica (Chile)* 66 (2), pp. 159 – 165.
- Ruiz E, Rosado A, Chan W, Alejo J, Mungía R.** (2009). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin sobre estados inmaduros de mosquita blanca (*Bemisia Tabaci* Genn.) *Fitosanidad*. Vol 13, no. 2.
- Trujillo Z, Pérez R, López M, Zamora C, Ocano C.** (2000) Evaluación de cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el combate de *Atta insularis* (Güerin). Instituto de Sanidad Vegetal. La Habana Cuba. *Fitosanidad*, vol. 4, núm. 3-4, septiembre – diciembre, pp. 81 – 84.
- Vázquez L.** (2002). Efecto de *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Cotesia americanus* (Lepeleteri) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de larvas de la primavera de la yuca (*Erinnys Willo* L.). *Fitosanidad*, vol. 6, núm. 1, marzo, pp. 25 – 27.

Vega F, Goetel M, Blackwell M, Chandler D, Jackson M, Keller S, Koike M, Maniania N, Monzón A, Ownley B, Pell J, Rangel D, Roy H. (2009). Fungal Ecology. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2, pp. 149 – 159.

Vélez – Arango P, Estrada – Valencia M, González – García M, Valderrama – Fonseca A, Bustillo – Pardey A. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica). N° 62, pp. 38 – 53.