

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera en Biotecnología de
los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ
(*Hypothenemus hampei*)”**

AUTORA:

JACKELINE LISSETTE FERNÁNDEZ AGUIRRE

TUTOR:

ING. JUAN GERARDO LOYOLA ILLESCAS, PhD

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Jackeline Lissette Fernández Aguirre con documento de identificación N° 0705120012, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*)”**. "mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

"

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que entrego el trabajo en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre den2020



Jackeline Lissette Fernández Aguirre

C.I. 0705120012

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*)”**.¹tealizado por Jackeline Lissette Fernández Aguirre, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre den2020



Ing. Juan Gerardo Loyola Illescas, PhD.

C.I. 0102378544

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Jackeline Lissette Fernández Aguirre con documento de identificación N° 0705120012, autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOPESTICIDA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei*)”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, octubre den2020



Jackeline Lissette Fernández Aguirre

C.I. 0705120012

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación, desde lo más profundo de mi corazón: Principalmente a Dios, por darme las fuerzas necesarias para vencer cada obstáculo en mis años de estudio. A mis padres Victor Hugo y Bedy Yolanda quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, inculcando en mí, grandes valores que han sido de fundamental importancia en mi formación académica. A mis hermanos Janina y Richard por darme el principal ejemplo de superación: lucha, estudio y excelencia. A mis queridos amigos y compañeros universitarios, especialmente Alejandro, Pamela, Danielle, Viviana, Jhuliana, Kelly y Karen por todos los momentos de amistad vividos en nuestros años de formación académica. A mis queridos profesores, Inés Patricia, Juan Gerardo, Jhison Enrique, Myriam Ximena, Vicente Hernán, Silvia Monserrath, Pablo Wilson y Luis Germán por toda su guía y conocimiento impartido durante mis años de estudio. Finalmente, a mi hermosa y por siempre querida alma mater, donde en cada rincón de sus instalaciones me formé tanto intelectual, moral como musicalmente.

A todos los llevo siempre en mi corazón ♥

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar un extenso agradecimiento a mi tutor, apreciado Ing. Juan Gerardo Loyola Illescas, PhD. quien, con sus conocimientos impartidos en cada clase, supo inculcar en mi persona el interés hacia la agroecología y manejo integrado de plagas; pudiendo así originar y llevarse a cabo este bonito trabajo experimental, que tiene como objetivo principal el incentivar a los agroproductores a reducir el uso de agroquímicos y afines.

A mí querida profesora y amiga Dra. Inés Patricia Malo Cevallos por toda su colaboración desinteresada para la realización de la metodología del presente trabajo, quien con sus consejos y enseñanza supo orientarme en cada paso de la investigación.

A las laboratoristas, Ing. Sandy Carolina Gavilanes Pozo y Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, por su colaboración y paciencia dentro de laboratorio mientras se llevaba a cabo la parte experimental de la presente.

A Juan Carlos Zhigue Serrano, quien a nivel de campo supo orientarme en cuanto al proceso de obtención del material biológico necesario para la realización de la investigación.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: grados Celsius

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

ANOVA: análisis de varianza

Ca²⁺: ión calcio

CL₅₀: concentración letal noventa y cinco

cm: centímetro

cm²: centímetro cuadrado

conidias mL⁻¹: conidias por mililitro

DL₅₀: dosis letal media

g/L: gramos por litro

HR: humedad relativa

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

L/ha: litros por hectárea

lbs: libras

LSD: diferencia mínima significativa

Mg²⁺: ión magnesio

mL: mililitros

mm.día⁻¹: milímetros por día

mm: milímetros

m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDA: agar papa dextrosa

pH: potencial hidrógeno

ppm: partes por millón

SDA: agar dextrosa Sabouraud

TDCR: tasa diaria de crecimiento radial

TL₅₀: tiempo letal medio

uL: microlitro

μm: micrómetro

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	3
1.3. Pregunta de Investigación.....	5
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General.....	5
1.4.2. Específicos	5
1.5. Hipótesis	6
1.6. Problema de Investigación.....	6
1.7. Limitaciones.....	8
CAPÍTULO II MARCO REFERENCIAL.....	9
2.1. <i>Hypothenemus hampei</i>	9
2.1.1. Origen y distribución geográfica	9
2.1.2. Taxonomía	11
2.1.3. Modo de dispersión.....	11
2.1.4. Hospederos.....	13
2.1.5. Comportamiento reproductivo	14
2.1.6. Biología.....	16
2.1.6.1. Morfología	16
2.1.6.2. Ciclo de vida	17
2.1.7. Hábitos	19
2.1.7.1. Atracción hacía un fruto.....	19

	X
2.1.7.2. Emergencia	19
2.1.8. Forma de ataque	20
2.1.9. Fenología del cafeto en relación con la broca.....	21
2.1.10. Daños que provoca.....	23
2.1.11. Control biológico de <i>Hypothenemus hampei</i>	24
2.1.11. Control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos.....	25
2.2. <i>Beauveria bassiana</i>	27
2.2.1. Origen y distribución geográfica	27
2.2.2. Taxonomía	28
2.2.3. Hospederos.....	29
2.2.4. Morfología	30
2.2.4.1. Características macroscópicas	30
2.2.4.2. Características microscópicas	30
2.2.5. Condiciones de crecimiento	32
2.2.6. Mecanismo patogénico	33
2.2.6.1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del hospedero	34
2.2.6.2. Penetración en el hemocele.....	35
2.2.6.3. Desarrollo del hongo.....	35
2.2.7. <i>Beauveria bassiana</i> en relación con <i>Hypothenemus hampei</i>	37
2.3. Métodos utilizados en la fase experimental	38
2.3.1. Medio de cultivo	38
2.3.2. Aislamiento de hongos.....	38
2.3.2.1. Método de aislamiento directo.....	39

	XI
2.3.3. Purificación de aislamientos	39
2.3.3.1. Cultivo Monospórico	39
2.3.4. Caracterización biológica.....	40
2.3.5. Determinación de la tasa de mortalidad de insectos	40
2.3.6. Análisis estadístico de Probit	41
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1. Características del lugar de estudio.....	42
3.2. Metodología	42
3.2.1. Fase de campo.....	42
3.2.1.1. Recolección del hongo <i>Beauveria bassiana</i> y de la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>	42
3.2.2. Fase de laboratorio	44
3.2.2.1. Caracterización biológica y cría de <i>Hypothenemus hampei</i>	44
3.2.2.2. Aislamiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i> a partir de granos infectados	44
3.2.2.3. Purificación del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	45
3.2.2.4. Caracterización biológica de <i>Beauveria bassiana</i>	46
3.2.2.5. Patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	49
3.2.3. Evaluación estadística.....	51
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1. Caracterización biológica de <i>Hypothenemus hampei</i>	52
4.2. Aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i>	52
4.2.1. Caracterización macroscópica	52
4.2.2. Caracterización microscópica	54

	XII
4.2.3. Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR	55
4.2.4. Evaluación del porcentaje de germinación de esporas	57
4.3. Patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	57
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
5.1. Conclusiones	64
5.2. Recomendaciones	65
REFERENCIAS.....	66
ANEXOS.....	80
Anexo 1. Hospederos de <i>Hypothenemus hampei</i>	80
Anexo 2. Obtención del material biológico para la fase experimental	82
Anexo 3. Caracterización biológica de <i>Hypothenemus hampei</i>	84
Anexo 4. Aislamiento, purificación y caracterización de <i>Beauveria bassiana</i>	85
Anexo 5. Patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i>	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ausencia de melanización completa en el tegumento de un adulto de <i>H. hampei</i> , observado al estereoscopio	17
Figura 2. Posicionamiento de <i>Hypothenemus hampei</i> según estado de maduración del fruto; a. búsqueda de frutos; b. inicio de perforación al fruto; c. inicio de perforación del endospermo; d. inicio de reproducción en el fruto.	21
Figura 3. Etapas del Desarrollo de los hongos entomopatógenos	26
Figura 4. Estructura de <i>Beauveria bassiana</i> ; a. aparato conidial; b. células conidiógenas; c. conidias	32
Figura 5. Ciclo de infección de <i>Beauveria bassiana</i> sobre un insecto	34
Figura 6. Lugar de muestreo de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Hypothenemus hampei</i>	43
Figura 7. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo de esporas	47
Figura 8. Modelo de viales para el bioensayo de patogenicidad, acondicionados con papel filtro y sustrato alimenticio	50
Figura 9. Presencia de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Hypothenemus hampei</i> en granos de café	82
Figura 10. Desinfección de granos recolectados	82
Figura 11. Cámara climática para la cría de los especímenes de broca.....	83
Figura 12. Obtención de los especímenes del insecto a partir de granos de café atacados a nivel de laboratorio	83
Figura 13. Vista lateral y dorsal del cuerpo del insecto.....	84
Figura 14. Características de la antena de <i>H. hampei</i>	84
Figura 15. Diferencia de tamaño entre una hembra y macho adultos.....	85

- Figura 16.** Presencia de dos pares de alas (élitros y alas membranosas) en una hembra adulta.. 85
- Figura 17.** Procedimiento de purificación del hongo mediante el método de aislamiento monospórico..... 86
- Figura 18.** Aislamiento primario y reaislamiento utilizado para cultivo monospórico 86
- Figura 19.** Colonia utilizada para caracterización macro y microscópica. 87
- Figura 20.** Características macroscópicas: anverso y reverso de la colonia de los diferentes aislamientos..... 87
- Figura 21.** Características microscópicas: forma y tamaño de las conidias del hongo..... 88
- Figura 22.** Características microscópicas: forma de las diferentes estructuras micromorfológicas del aislamiento, tales como: aparato conidial, células conidiógenas, raquis en forma de zigzag y conidias..... 88
- Figura 23.** Características microscópicas: forma y tamaño del aparato hifal. 89
- Figura 24.** Cepas utilizadas para la evaluación de la velocidad de crecimiento..... 89
- Figura 25.** Vista microscópica de las esporas del hongo para evaluación de su germinación..... 89
- Figura 26.** Ensayo de patogenicidad de los distintos tratamientos sobre los especímenes de broca a nivel de laboratorio 90
- Figura 27.** Izquierda: a simple vista, reducción de actividades motoras y de alimentación en adultos de broca al entrar en contacto con las distintas concentraciones del hongo; derecha: vista al estereoscopio de los mismos especímenes de la imagen izquierda, con inicio de crecimiento fungoso en su morfología..... 90
- Figura 28.** Vista al estereoscopio: izquierda: inicio del crecimiento fungoso sobre el cuerpo (ano) de un adulto broca; derecha: cadáver irreconocible de un adulto broca completamente cubierto por el micelio del hongo. 91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Hypothenemus hampei</i>	11
Tabla 2. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	29
Tabla 3. Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	33
Tabla 4. Tratamiento, número de repetición, concentración del inóculo y número de brocas utilizadas para el bioensayo de patogenicidad.	49
Tabla 5. Características macroscópicas observadas en los aislamientos	53
Tabla 6. Características microscópicas observadas en los aislamientos	55
Tabla 7. Longitud de radio y velocidad de crecimiento radial (concentración 1×10^8 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo	55
Tabla 8. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 4to día post inoculación.....	59
Tabla 9. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 6to día post inoculación.....	59
Tabla 10. Hospederos alternos de <i>Hypothenemus hampei</i>	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento radial (concentración 1×10^8 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.....	56
Gráfica 2. TDCR (concentración 1×10^8 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.....	57
Gráfica 3. Mortalidad acumulada de adultos de <i>H. hampei</i> con relación a la concentración empleada y los días de ensayo.	58
Gráfica 4. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de <i>H. hampei</i> según las variables dosis - respuesta.....	61
Gráfica 5. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de <i>H. hampei</i> según las variables tiempo - respuesta.....	62

RESUMEN

Hypothenemus hampei es considerada como una de las plagas de mayor importancia económica para especies del género *Coffea*; el ataque directo al grano provoca una reducción en la calidad del producto final hasta en un 80%. Una alternativa para el manejo integrado de este insecto implica el uso de controladores biológicos. El presente estudio planteó evaluar la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para la determinación del porcentaje de control del hongo sobre este insecto. Los especímenes de *Hypothenemus hampei* y *Beauveria bassiana* se obtuvieron de frutos de *Coffea arabica* del cantón Zaruma y a nivel de laboratorio se realizó la caracterización taxonómica y cría artificial del insecto; purificación y valoración del rendimiento del hongo según la TDCR y porcentaje de germinación. La capacidad patogénica fue evaluada utilizando distintas concentraciones del hongo y registrando mortalidad de la población de broca en base a los parámetros DL_{50} , CL_{50} y TL_{50} . Se utilizó un diseño completamente al azar y las variables de respuesta se calcularon mediante el análisis estadístico LSD de Fischer y regresión de Probit. Se registró una TDCR de $3,45 \text{ mm.día}^{-1}$ y un porcentaje de germinación del 96,6%, además de obtener una mortalidad del 60,33% y 96,66% al 4to y 6to día post inoculación del tratamiento, a una concentración de 1×10^8 conidias mL^{-1} . La DL_{50} y la CL_{50} fueron de $8,05 \times 10^7$ y $1,51 \times 10^8$ conidias mL^{-1} respectivamente mientras que el TL_{50} fue de 6,07 días. Los valores indicados corroboran la susceptibilidad de *Hypothenemus hampei* a ser controlado por *Beauveria bassiana*.

Palabras clave: hongo entomopatógeno, broca del café, mortalidad, actividad biopesticida.

ABSTRACT

Hypothenemus hampei is considered to be one of the most economically important pests for species of the genus *Coffea*; the direct attack on the grain causes a reduction in the quality of the final product by up to 80%. An alternative to the integrated management of this insect involves the use of biological controllers. This study planned to evaluate the biopesticide activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for the determination of the percentage of control of the fungus over this insect. The specimens of *Hypothenemus hampei* and *Beauveria bassiana* were obtained from *Coffea arabica* fruits from the canton Zaruma and at the laboratory level, taxonomic characterization and artificial breeding of the insect was performed; purification and assessment of fungus yield according to TDCR and germination percentage. Pathogenic capacity was assessed using different concentrations of the fungus and recording berry borer population mortality based on the DL₅₀, CL₅₀ and TL₅₀. A completely random design was used and response variables were calculated using Fischer's LSD statistical analysis and Probit regression. A TDCR of 3.45 mm.day⁻¹ and a germination rate of 96.6% were recorded, in addition to obtaining mortality of 60.33% and 96.66% at 4th and 6th day post-inoculation of treatment, at a concentration of 1x10⁸ conidis mL⁻¹. DI₅₀ and CL₅₀ were 8.05x10⁸ and 1.51x10⁸ conidias mL⁻¹ respectively while TL₅₀ was 6.07 days. The indicated values corroborate the susceptibility of *Hypothenemus hampei* to be controlled by *Beauveria bassiana*.

Key words: Entomopathogen fungus, coffee berry borer, mortality, biopesticidal activity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El café es un arbusto nativo de África, perteneciente al género *Coffea* que se subdivide en 123 especies de las cuales dos se utilizan para fines comerciales, destacando las especies *C. arabica* y *C. canephora*. La producción de café es una de las prácticas agrícolas más importantes debido a la altísima demanda en su consumo a nivel mundial (Román Ruiz, 2017). La Organización Internacional del Café (2020), señala que en el año 2019 la población mundial consumió más de 160 millones de sacos y hoy por hoy cerca de 20 millones de familias alrededor del globo dependen de la actividad cafetalera.

En Ecuador la producción de este vegetal es bastante considerable; durante los últimos 15 años, el cultivo de café se ha ubicado entre los primeros nueve cultivos con mayor superficie cosechada ya que es producido en 23 de las 24 provincias existentes (ANECAPÉ, 2017).

Es bien sabido que la actividad agrícola se ha visto amenazada desde tiempos remotos, por la presencia de plagas; la actividad cafetalera exagera este problema debido a la presencia de la broca (*Hypothenemus hampei*), considerada como la plaga insectil más perjudicial del cultivo de café a nivel mundial puesto que ataca principalmente a las especies comerciales *C. arabica* y *C. canephora* (Párraga, 2017). Una investigación de Bustillo (2008), señala que el uso de productos químicos, el crecimiento del monocultivo y revolución verde han causado un incremento masivo de la broca del cafeto, con pérdidas de hasta el 80% de la cosecha.

La broca del café afecta considerablemente a la producción y calidad del grano, atestando a la mayoría de los cultivos en donde se encuentre presente; la hembra perfora el fruto y coloca

sus huevos en el endospermo, los cuales eclosionan dando origen a las larvas, causantes de considerables pérdidas económicas (Párraga, 2017).

En cuanto al tema de caficultura nacional, se menciona el serio problema que causa la presencia de este insecto; fue en 1981, en la zona de Zumba, provincia de Zamora-Chinchipe, donde se observó, por primera vez, a la broca del fruto y desde aquel entonces ha logrado diseminarse con enorme rapidez alcanzando altos niveles de infestación en todo el país (Sotomayor & Duicela, 1995).

Datos expuestos por el informe del Rendimiento de café grano seco en Ecuador del 2017, señalan que la cosecha de 2016 presentó un grave problema de infestación de broca en los cafetales ya que el conteo normal de esa plaga en una plantación de café es del 3%, pero en 2016 fue del 20% al 30%.

Según Vásquez *et al.* (2012), se han adoptado diferentes estrategias para el control de la broca del café, tales como el uso de insecticidas químicos, integración de controladores biológicos, instalación de trampas de captura y varias prácticas culturales.

En Ecuador, antiguamente el INIAP recomendaba el uso de los insecticidas químicos lindano y endosulfán para el control de broca, pero hoy en día debido a su alta toxicidad, son prohibidos para uso en agricultura. Algunos manuales de manejo del cultivo del café en el país recomiendan aplicar control químico de este insecto durante la cosecha, realizando fumigaciones con químicos como bromuro de metilo o fosfuro de aluminio (Zambrano *et. al.*, 1995).

Según Bravo (2019), al aplicar un insecticida químico se alteran los ecosistemas naturales ocasionando conversión de ambientes, pérdida de hábitats, especies y sus interacciones

El presente estudio plantea comprobar la eficacia del manejo integrado de plagas, con el propósito de incentivar al sector cafetalero el disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas, sacar el máximo provecho al control biológico, verificando la acción biopesticida del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

1.2. Justificación

Los métodos tradicionales de control de plagas en el Ecuador, en especial, el uso de plaguicidas, han demostrado ser poco eficaces o simplemente mantener a la plaga bajo el umbral económico (Jaramillo *et. al*, 2015).

Según la WHO (2010), existen cuatro categorías de clasificación para los plaguicidas: extremadamente peligroso, altamente peligroso, moderadamente peligroso y ligeramente peligroso y dentro de los 1985 plaguicidas registrados en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad), la autoridad nacional sanitaria, fitosanitaria y de inocuidad de los alimentos adscrita al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, se encuentran productos de categorías extrema y altamente peligrosos. La norma ecuatoriana los prohíbe para aplicaciones aéreas, sin embargo, la misma legislación permite venderlos según la prescripción de un ingeniero agrónomo (Pinto, 2015).

En el año 2016 se perdió el 3,38% de la superficie agropecuaria ecuatoriana, principalmente por la presencia de plagas, afectando tanto a cultivos permanentes como transitorios en un total del 34,60%. Del total de superficie plantada, el 64,13% de los cultivos utilizó insumos químicos. Y del total de insecticidas, el 33,54% fue de grado de toxicidad III, es decir, moderadamente peligroso (Bravo, 2019).

Una investigación de Naranjo (2017) señala que la importación de plaguicidas en los últimos años en Ecuador es de situación preocupante. Cerca de 37.000 toneladas fueron importadas a un valor de \$261 millones en el año 2015.

Los plaguicidas causan impacto negativo al ambiente ya que el residuo de su aplicación se moviliza a través del aire y escorrentía y así, afecta a los diferentes recursos (aire, agua, suelo) además, alteran la cadena trófica natural y ponen en peligro la salud del ser humano ya que 1 de cada 7 trabajadores se intoxica por el uso de estos productos (WHO, 2010).

La broca del café, *Hypothenemus hampei*, es la principal plaga del café en Ecuador y provoca un descenso del 27,16% en la productividad de los cafetales del territorio nacional. Este insecto, debido a sus hábitos, presenta dificultades para su control ya que el adulto está protegido en el interior de los frutos y se reproduce rápidamente (Zeas, 2015).

Uno de los plaguicidas de mayor eficacia para el control de la broca del café en Latinoamérica según Batistella *et al.* (1983), ha sido el endosulfán clasificado por la OMS como “moderadamente peligroso”. Actualmente el endosulfán en Ecuador se encuentra prohibido por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario debido a su toxicidad.

Otros plaguicidas para el control de la broca del café que son permitidos en el Ecuador son los clorpirifos, metilpirimifos, carbaryl, entre otros, clasificados toxicológicamente según la Norma Técnica Ecuatoriana (1996), en las categorías II y III, es decir, moderada y ligeramente peligrosos (Heredia Rivera, 2015).

La riqueza y diversidad biológica que presenta la región cafetera del Ecuador hacen deseable establecer una estrategia de control más ecológica como es el manejo integrado con énfasis en prácticas agronómicas y de control biológico. En Colombia, el hongo entomopatógeno

Beauveria bassiana se encuentra atacando a la broca del café desde el año 1900, estableciéndose así una relación directa entre el hongo y el insecto. Actualmente *Beauveria bassiana* es considerado como el principal controlador biológico de *Hypothenemus hampei* ya que ha ocasionado mortalidad del insecto en todos los países donde ha alcanzado territorio, además de encontrarse naturalmente en todos los suelos del mundo. El hongo hace parte de la estrategia de manejo integrado de esta plaga y su uso es recomendado por el Centro Nacional de Investigaciones de Café Colombiano CENICAFÉ (Mestre & Salazar, 2015).

1.3. Pregunta de Investigación

¿Es posible controlar a la broca del café (*Hypothenemus hampei*) mediante la presencia de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*?

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Evaluar la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*) para la determinación del porcentaje de control del hongo sobre el insecto.

1.4.2. Específicos

Aislar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* de los cafetales del cantón Zaruma mediante su propagación *in vitro* para la determinación de sus características de crecimiento.

Determinar la tasa de mortalidad de *Hypothenemus hampei*, mediante pruebas de toxicidad por contacto directo con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, para la constatación de su actividad biopesticida.

Evaluar los resultados de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante pruebas estadísticas, para la determinación de la DL₅₀ y TL₅₀ sobre *Hypothenemus hampei*.

1.5. Hipótesis

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* tiene propiedad biopesticida sobre *Hypothenemus hampei*.

1.6. Problema de Investigación

El presente trabajo de investigación hace hincapié al control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) ya que es considerada según estudios de Mendoza (2014), como la plaga más perjudicial para el grano de café a nivel mundial.

Cifras que arroja el Boletín Situacional del café del 2019, señalan que en Ecuador existe una superficie plantada de café de 61.254 hectáreas con un rendimiento de 0.30 toneladas por hectárea, además de que este cultivo es un producto primordial para el sector agropecuario dada la generación de ingresos que implica su exportación; solamente en el año 2017 se exportaron cerca de 40.741 toneladas de café en grano (SIPA, 2017).

La problemática fitosanitaria a la que se expone el sector cafetalero es cuantiosa ya que el 58% de los cafetales del país se ven afectados por plagas y enfermedades, encontrándose un 14% de cafetales de la especie *C. arabica*, y un 28% de cafetales de la especie *C. canephora* atacados por broca (SIPA, 2018; SIPA, 2019).

El rendimiento de la productividad del sector cafetalero según el Reporte de Coyuntura del Sector Agropecuario del 2019 se vio afectado principalmente por problemas de plagas y

enfermedades, con un descenso del 22,52%, impactando al valor del quintal el cual descendió de \$119 a \$92 con respecto al año 2017.

Un estudio de Mendoza (2014), menciona que los agroproductores ecuatorianos acceden fácilmente al control químico de plagas, encontrándose el manejo integrado de plagas en un plano secundario, poco importante o sin consideración. Según la encuesta del módulo de Información Agroambiental y Tecnificación Agropecuaria del 2018 el 66,05% del sector agrícola del país utiliza insumos de origen químico, tales como fertilizantes y plaguicidas; dentro de este valor, en el 50,7% de los cultivos permanentes (donde se ubica el cultivo de café) se utilizan insumos químicos.

Antiguamente el INIAP recomendaba el control de la broca del café en el Ecuador mediante aplicaciones de insecticidas químicos como lindano y endosulfán en dosis de 1,5 – 2 L/ha (Sotomayor & Duicela, 1995). Hoy en día la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, prohíbe estrictamente el uso de este tipo de productos químicos debido a su alta toxicidad

Algunos manuales de manejo del cultivo del café en el país recomiendan realizar el control químico de la broca durante la cosecha, realizando fumigaciones con químicos como bromuro de metilo o fosforo de aluminio, pero la inversión de este método de control resulta arriesgada debido a la dependencia que causan estos productos y por ende a su frecuente adquisición, añadiendo el riesgo de intoxicación al que se somete directamente el agricultor, e indirectamente el consumidor. Los niveles de exposición ante bromuro de metilo para matar varían de 1.600 a 60.000 ppm, dependiendo de la duración del contacto. Si se inhala una alta concentración en breve periodo, produce mareo, náusea, vómito, convulsiones, etc. (Zambrano *et al.*, 1995).

Corroborando esto, varios estudios revelan que, en Ecuador, dentro de los productos destinados a la canasta básica familiar, se detectó la presencia de altos porcentajes de sustancias químicas nocivas para la salud; de cada 10 productos al menos 8 contienen restos de algún agroquímico (Heredia Rivera, 2015).

La agricultura convencional promueve el uso de agrotóxicos, fertilizantes y semillas híbridas o transgénicas para un modelo de producción "resiliente"; este modelo mantiene la dependencia de insumos que, como se ha comprobado, únicamente provocan destrucción de ecosistemas, alteraciones en la cadena trófica, eliminación de enemigos naturales y debilitamiento nutricional de los cultivos, llevando a los agricultores a un ciclo de consumo sin término alguno (Naranjo, 2017).

1.7. Limitaciones

En el presente trabajo de investigación es necesario aislar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y al insecto *Hypothenemus hampei* de los cafetales en donde crecen naturalmente, distinguiéndose como limitación el no poder acceder fácilmente tanto al hongo como al insecto, viéndose involucrado el tiempo de la investigación.

Las condiciones ambientales naturales, tanto temperatura, altura, humedad y época del año, se establecen como limitantes ya que, al aislar ambos organismos (*Beauveria bassiana* e *Hypothenemus hampei*), trasladarlos y someterlos a un hábitat diferente, pueden ocasionar un malogro en la investigación.

Otra limitante para tener en cuenta es el acceso a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad, debido al uso por parte de estudiantes, practicantes y tesisistas, todo esto con relación al espacio, área de trabajo y requerimiento de equipos necesarios.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

2.1. *Hypothenemus hampei*

2.1.1. Origen y distribución geográfica

Hypothenemus hampei es un coleóptero comúnmente conocido como broca del café, gorgojo del café, barrenillo del grano del café o taladro de cereza del café cuyo origen proviene de la selva tropical de África central, principalmente de los cafetales de la especie robusta (*Coffea canephora*) (Bustillo, 2002).

En el año de 1867, el entomólogo austríaco J.A. Graft Ferrari visualiza por primera vez al insecto en almendros infectados, y lo nombra originalmente como *Cryphalus hampei*; posteriormente, Roepke reubica al insecto en el género *Stephanoderes* pero es Costa Lima, en el año de 1928, quien realiza un estudio comparativo de especies de *Stephanoderes* e *Hypothenemus* pero al no encontrar una diferencia significativa en sus morfologías propone unificar al género en *Hypothenemus*. En 1901 es considerada netamente como plaga por E. Fleutiaux al ser encontrada atacando a frutos del Congo y en el año de 1913 se reporta por primera vez en el continente americano, atacando a cafetales de Brasil; tras este hecho, el insecto no tarda en diseminarse por el resto del continente y posteriormente por todo el mundo (Klein, s.f.).

En su investigación Bustillo *et al.* (1996), afirman que la broca del café ha sido asociada antiguamente con los nombres de *Xylehorus coffeivorus* por Van der Weele en 1910, *Xylehorus coffeicola* por Campos Novaes en 1922 y *Stephanoderes coffeae* por Growdey en 1910.

En el año 2005 el investigador colombiano P. Benavides, realizó un análisis molecular de la distribución de la broca a nivel mundial, cuya información refiere que el insecto se diseminó

hacia el continente asiático desde el oeste africano y que el mismo procedimiento pudo haber ocurrido en América. El estudio se basó en la recolección de muestras de broca procedentes de 17 países de África, Asia y América para posteriormente realizar la amplificación de cientos de *loci* de las muestras de ADN de los especímenes por medio de la técnica AFLP. La investigación constató que *H. hampei* es nativa de Etiopía y su diseminación mundial provino de insectos del oeste africano, además se corroboró la teoría de que la broca del café habría sido inicialmente introducida en Brasil, continuando su dispersión por el resto del continente (Bustillo, 2006).

Actualmente, es considerada como una de las plagas de mayor importancia económica para el café y se encuentra atacando a cafetales de alrededor de 70 países, de los cuales 19 pertenecen a América: Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, Surinam y Venezuela (Franqui & Medina Gaud, 2003).

Este insecto fue registrado por primera vez en Ecuador en el año de 1981 en la zona de Zumba, provincia de Zamora-Chinchipec y a partir de la fecha se ha dispersado por todas las regiones cafeteras del país, debido a las condiciones favorables para su desarrollo como el clima, la continuidad del cafetal y el grado de tecnificación (Yanez, 2016).

Una investigación de Abebe (1998), señala que este insecto se ha encontrado en altitudes por debajo de los 1000 y no más de 1900 m.s.n.m, con una infestación relativamente alta en altitudes más bajas; por su parte Sotomayor & Duicela (1993) mencionan que, los ataques más severos ocurren en cafetales situados abajo de 1000 m.s.n.m. y en Ecuador no se ha evidenciado presencia de la plaga en altitudes por encima de los 1500 m.s.n.m.

2.1.2. Taxonomía

El estudio de Lagos (2009), ubica a *Hypothenemus hampei* en la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 1. Taxonomía de *Hypothenemus hampei*

Reino	Animalia
Clase	Insecta
Orden	Coleoptera
Familia	Curculionidae
Subfamilia	Scolytinae
Género	<i>Hypothenemus</i>
Especie	<i>hampei</i> (Ferrari)

Fuente: Lagos (2009)

2.1.3. Modo de dispersión

Tal cual, como muchos insectos, la broca del café emplea la migración como mecanismo de supervivencia. El fenómeno de dispersión se ve directamente influenciado por factores abióticos y bióticos, como la intensidad lumínica, temperatura, lluvia, condición del fruto, fisiología del insecto etc. y en él participan únicamente las hembras colonizadoras ya que los machos no tienen capacidad para volar (López *et al.*, 2011).

La hembra emerge del fruto, emprende vuelo y se dispersa elevándose verticalmente hasta encontrar corrientes de aire que la arrastren a otros sitios; este insecto es capaz de volar por más de tres horas en vuelos sucesivos y libremente por un período de una hora y media. La broca del café se adaptó a este hábito de desplazamiento cuando en su natal África existía una gran diversidad de especies vegetales y los cafetos tenían deficiente producción de frutos, es por eso, que realizaban largos vuelos hasta encontrar un hábitat en donde sobrevivir (Mestre & Salazar, 2015).

Otras investigaciones referentes al tema demuestran que la broca no tiene gran capacidad de vuelo; la hembra está limitada a realizar de 20 a 100 minutos de vuelo libre y más de tres horas

de vuelos sucesivos. Debido a esto su método principal de dispersión es a través de granos infestados y por medio de herramientas o utensilios de los campesinos que entran en contacto con ella (Baker, 1986). En su estudio Sotomayor & Duicela (1993), señalan que *H. hampei* realiza una mayor actividad de dispersión en horas de la tarde, entre las 14 y 18 horas.

En zonas tropicales cafetaleras, el ciclo fenológico del cultivo de café (floración y fructificación) da paso a la aparición de dos épocas: sequía y lluvia, las mismas que intervienen en el fenómeno natural de dispersión de la broca.

Es en la época de sequía donde ocurre una mayor dispersión de las hembras colonizadoras, justamente después de la cosecha y antes del desarrollo del nuevo fruto, período conocido como intercosecha. En este período son ausentes los frutos viables para el desarrollo y reproducción de la broca y los adultos se refugian en el interior de frutos caídos al suelo o en aquellos que quedan adheridos a las ramas para sobrevivir ante el desfavorable clima. Durante esta época las hembras entran en un estado llamado diapausa reproductiva. Cuando el período de sequía está por terminar se dan las primeras lluvias y las hembras emergen masivamente en búsqueda de nuevos frutos a colonizar por lo que la diapausa reproductiva termina. Durante el período de fructificación no se da una gran dispersión del insecto, sin embargo, debido a la disponibilidad de frutos adecuados para la reproducción, la plaga se multiplica rápidamente (López *et al.*, 2011).

Una investigación de Mansingh (1991), refiere que la hembra de *H. hampei*, se dispersa en la periferia del sitio durante la época de fructificación del café, mientras que en el período de intercosecha tiende a dispersarse a largas distancias.

Gracias a la presencia constante, prácticamente incesante, de la broca en un cafetal, se torna una práctica casi imposible para los agricultores el erradicarla completamente, es por ello que una

vez que la plaga se encuentre en una zona cafetalera, los caficultores deben aprender a convivir con ella (FEDERACAFE, 2010).

2.1.4. Hospederos

Hypothenemus hampei es un insecto monófago que se desarrolla y cumple enteramente su ciclo vital en especies del género *Coffea* sp., principalmente en las variedades arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora*) causando un importantísimo impacto económico a la producción de café debido a que ataca al cerezo en cualquier estadio de desarrollo preferentemente en estado de maduración, sobremaduración o seco (Chalfoun *et al.*, 1984).

Se ha reportado la presencia ocasional de este insecto en géneros de la familia de las fabáceas, tales como *Tephrosia*, *Crotalaria*, *Centrosema* y *Celsapinia*. Su paso ocasional por estos géneros se debe a que *Hypothenemus hampei* no es capaz de completar su desarrollo debido al déficit de nutrientes que aportan estas plantas. También se ha reportado descendencia en semillas de hibiscus, rubus, fréjol, gandul, guaba, poró y maíz, pero sin éxito de reproducción masiva (Hernández, 2005). Investigaciones de Barrera (2012) y Damon (2000), corroboran lo mencionado, señalando que *H. hampei* ha utilizado a más de 40 especies de plantas distintas al café como hospederas primarias, indispensables para alimentación y reproducción, y hospederas alternas, utilizadas como alimento o refugio temporal. En el Anexo 1 se presenta un listado de hospederos de *H. hampei*.

Un experimento de Román Ruiz (2017), en cafetales de Honduras, demostró que la broca, en el período de inter cosecha, busca refugios temporales donde descansar y sobrevivir al clima adverso mientras no encuentra frutos viables. En la investigación se registró la presencia del insecto en plantas aledañas al cafetal tales como el ricino (*R. communis*), leguminosas como *C.*

maypurensis, *C. cajan* y en Laurales como *Nectandra* spp. También se determinó que la hembra colonizadora es capaz de refugiarse en el pedúnculo y la hojarasca del propio cafetal. Los insectos utilizados en el experimento sobrevivieron hasta 16 días en los frutos del ricino y de las leguminosas mencionadas. En ningún caso se encontró oviposición, ni siquiera en la leguminosa *C. cajan* mencionada por Campos Almengor (1981), como hospedera primaria de *H. hampei*; de igual manera se demostró que las brocas sobreviven de 7 a 10 días en ambientes secos y hasta 20 días en ambientes mojados, bebiendo agua del ambiente, lo que hace posible para el insecto el encontrar un hospedero viable, ya que se evita una temprana muerte por deshidratación.

Por su parte, Sponagel (1994) señala sobre *H. hampei* que, al no ser específico al café, plantas de varias familias proveerían condiciones apropiadas para su reproducción, reduciendo el impacto sobre las plantaciones de café si se crea una especie de interacción biológica.

2.1.5. Comportamiento reproductivo

Brun *et al.* (1995) señalan en su investigación que, la progenie de *H. hampei* está conformada principalmente por un número mayor de hembras que de machos; este fenómeno denominado espanandria se relaciona directamente con la endogamia. Según Bustillo *et al.* (1996), por cada 1 macho existen 10 hembras y debido a este factor, es posible que todas las hembras en condiciones de campo o laboratorio se encuentren fecundadas. Chalfoun *et al.*, (1984), corroboran esta teoría al demostrar que el 100% de hembras que abandonan naturalmente los granos infestados se encuentran en fecundación.

Los machos no vuelan y permanecen dentro del fruto, cumpliendo una función específicamente reproductora, mientras que las hembras, antes de salir del fruto, copulan con sus

hermanos para posteriormente ir a colonizar nuevos frutos de café; el cruce entre progenies promueve la alta endogamia en una población de broca (Lazo, 1990).

La espanandria suele asociarse con la haplodiploidía, en la cual los machos haploides se desarrollan partenogénicamente a partir de óvulos no fecundados. Sin embargo, no se ha comprobado que *H. hampei* sea verdaderamente haplodiploide además de que la haplodiploidía no se ha relacionado con la subfamilia a la que pertenece el insecto. En su investigación Brun *et al.* (1995), quién trabajo con poblaciones de broca en Nueva Caledonia, demostró que tanto machos como hembras, sometidos a examen citológico, presentaron diploidía, pero, la meiosis aparentemente se vio modificada en los machos para que los cromosomas derivados del padre no se transmitan a su descendencia. El mecanismo diplodiploide que utiliza comúnmente la broca para reproducirse se expresa al final como una haplodiploidía funcional, pues al atrofiarse el cromosoma que determina el sexo del macho durante la meiosis, sólo se expresan los cromosomas maternas. En pocas palabras, la descendencia de la broca hereda estrictamente la información genética procedente de la madre (Barrera, 2012; Rudinsky, 2017).

La haplodiploidía no es el único medio por el cual una especie puede mantener desviaciones en la proporción de sexos; otros mecanismos como la presencia de microorganismos también pueden causar distorsión de la proporción de sexos. Investigaciones sostienen que la causante de la determinación sexual en una población de broca, en la que predominan las hembras sobre los machos, sería una probacteria del género *Wolbachia*, encontrada como una endosimbionte en la broca. Sin embargo, esta condición no ha impedido que esta plaga sea uno de los organismos invasores más exitosos que se conocen (Vega *et al.*, 2002).

2.1.6. Biología

Un estudio de Jaramillo *et al.* (2006), indica que la broca del café es un insecto holometábolo que completa cuatro fases de vida: huevo, larva, pupa y adulto.

2.1.6.1. Morfología

Se describe a continuación la morfología de los diferentes estadios según Constantino *et al.* (2011) y Klein (s.f.):

Huevo: los huevos son hialinos, brillantes, lisos, de color blanco lechoso a blanco amarillento y de forma elíptica; cuando las hembras realizan su oviposición en granos de café seco, estos se tornan de forma cilíndrica. Miden de 0.50 a 0,70 mm de largo por 0,30 a 0,40 mm de ancho. Los huevos de hembras vírgenes presentan una curiosa característica ya que su aspecto es lechoso y sin brillo.

Larva: las larvas de *H. hampei* son similares a un grano de arroz cocido, blandas y de color blanco crema; son de tipo curculioniforme, ápodas y encorvadas, poseen setas o pelos y son delgadas en la parte posterior. La cabeza es de color marrón y en ella se encuentran un par de mandíbulas bien desarrolladas. Las larvas recién nacidas miden aproximadamente 0,8 mm de largo y cuando completan su desarrollo llegan a medir entre 1.80 a 2.30 mm de largo.

Pupa: la pupa es el estadio más grande de *H. hampei*; posee una apariencia similar a la larva, pero de tipo exarata, color blanco lechoso al principio y al cabo de dos días de color crema. Desde este estadio se comienza a diferenciar entre sexos ya que la hembra por lo general es más grande y mide entre 1.70 y 2 mm de largo mientras que el macho mide de 1.26 a 1.42 mm. La cabeza de la pupa se encuentra completamente cubierta por el pronoto y se aprecian claramente las antenas y partes bucales.

Adulto: en la fase adulta se puede diferenciar que la hembra es el sexo de mayor tamaño y llega a medir de 1.25 a 1.82 mm de largo mientras que el macho solamente mide entre 1 y 1,25 mm de largo. Inicialmente su coloración es castaño claro debido a la no completa melanización (ver Figura 1), pero posteriormente el desarrollado insecto se torna de color castaño oscuro a negro. La cabeza del adulto posee forma globular y se encuentra escondida dentro de un semiesférico protórax, se evidencia el aparato bucal de tipo masticador; las antenas se componen de una coyuntura similar a un codo y en los últimos cinco segmentos se visualiza una especie de clava. Las hembras de *H. hampei* tienen dos pares de alas de las cuales el primer par son unos élitros con rayas paralelas y cubiertos de pelos mientras que el segundo par son alas membranosas que sirven para emprender vuelo. Los machos están desprovistos del segundo par de alas membranosas que posee la hembra, por ende, no tienen capacidad para volar.



Figura 1. Ausencia de melanización completa en el tegumento de un adulto de H. hampei, observado al estereoscopio

Fuente: autora

2.1.6.2. Ciclo de vida

La broca del café es un insecto multivoltino. Un sinnúmero de autores manifiesta que la temperatura es una condición muy importante en cuanto al tiempo de desarrollo de los diferentes

estadios, además de las condiciones ambientales que se presenten. Según Lezaun (2016), el ciclo de vida de *H. hampei* dura entre 24 y 48 días conforme las condiciones climáticas, mientras que Hernández (2005), señala que el ciclo de vida de este insecto puede variar de 30 hasta 90 días.

A una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ se describen a continuación, los diferentes estadios de *H. hampei*:

Huevo: una vez que el adulto hembra de la broca del café emerge de la fase pupal tarda unos 4 días en estar listo para la cópula, la cual se realiza en el interior del fruto. El período de oviposición es de aproximadamente 20 días y coloca de 2 a 3 huevos por día. Una hembra puede llegar a ovipositar hasta 75 huevos en su ciclo vital; el período de desarrollo de los huevos en incubación varía de 4 a 5 días, mientras que otros autores manifiestan que este ciclo se cumple al cabo de 7,6 días; cabe recalcar que la oviposición se realiza netamente en el interior del grano de café e inicia cuando la hembra realiza un orificio en la corona de este y se adentra para realizar la postura. El estado de maduración del fruto es esencial para la oviposición, ya que la hembra elige los frutos más adecuados en cuanto al estado de maduración.

Larva: el período larval puede durar de 12 a 15 días para el macho y 19 días para la hembra; la fase intermedia entre el período larval y la fase pupal es la prepura y dura aproximadamente 2 días.

Pupa: posteriormente, la fase de pupa llega a durar entre 6 y 9 días y por lo general el macho completa esta fase antes que la hembra.

Adulto: el desarrollo completo del insecto (hasta llegar a convertirse en adulto) puede durar de 23 a 30 días. El adulto vive aproximadamente 40 días, aunque algunas investigaciones han

demostrado que puede llegar a vivir hasta 100 días, mientras que la hembra logra vivir de 135 a 190 días (Klein, s.f.; Lezaun, 2016).

2.1.7. Hábitos

2.1.7.1. Atracción hacia un fruto

Estudios demuestran que *H. hampei* puede ser atraída y capaz de sobrevivir en un fruto que presente ciertas características, tales como olor, color, forma, estado de maduración y especie; todos estos factores se encuentran directamente relacionados con las condiciones propias del hábitat en donde el cafetal se desarrolle, como el clima, la altitud y la precipitación. Los desechos de cerezos brocados e incluso las heces del mismo insecto son considerados en segundo plano como atractivos. Los frutos infestados por broca se convierten en un vector de infestación de frutos aledaños (Duicela *et al.*, 2004).

Por su parte, una investigación de Abebe (1998), manifiesta que la hembra de *H. hampei* no es capaz de diferenciar entre cerezos en diferentes etapas de maduración y la principal vía de atracción hacia el fruto sería la cantidad de cafeína presente en un grano y el aroma de este.

2.1.7.2. Emergencia

Investigaciones sobre hábitos en la emergencia de la broca de un fruto refieren que, un individuo puede permanecer dentro de un grano del café hasta encontrar las condiciones adecuadas para emerger, tales como la lluvia, principalmente luego del período de sequía (Mansingh, 1991). Baker (1986), comprobó esta teoría al realizar una investigación de laboratorio con un grupo específico de brocas; el experimento constó de dos lotes de cerezas infestadas por broca, el primer lote fue mojado con agua durante tres horas, mientras que el segundo lote permaneció seco. Al día

siguiente emergieron hasta diez veces más brocas de las cerezas mojadas que de las cerezas secas. Por otro lado De Kraker (1988), señala que la lluvia en sí misma no es el detonante, los cerezos del café se inundan y se vuelven inhabitables, he ahí la emergencia masiva del insecto.

2.1.8. Forma de ataque

La broca es un escolítido del género *Hypothenemus*. Los escolítidos se caracterizan por atacar madera o sustancias duras como semillas. *H. hampei* ataca específicamente al cerezo del café convirtiéndose en el insecto plaga de mayor agresión para el café (Posada-Flores & Pava, 2009; Urbina, 1987).

En su estudio Román Ruiz (2017), menciona que las hembras atacan directamente a los frutos para su alimentación e indirectamente mediante oviposición, alimentación y emergencia de su progenie.

La hembra, luego de aterrizar, camina sobre las ramas, hojas y cerezos del café hasta seleccionar el fruto adecuado para comenzar la penetración, la cual se lleva a cabo por el centro del disco del fruto, corona u hostiolo (ver Figura 2), y muy rara vez a los lados de esta (Duicela *et al.*, 2001). De Ingunza (1966), manifiesta que la broca ataca por el disco, porque su superficie es la única región del fruto que le brinda un buen punto de apoyo.

La hembra se alimenta y reproduce en el endospermo de la semilla del fruto del café; perfora el cerezo utilizando sus mandíbulas, mordiendo y arrancando tejido para posteriormente expulsarlo como aserrín por medio de sus patas. Luego de esto, y según el estado de maduración del fruto, excava a través del exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio hasta llegar al endospermo, lo que puede tardar, hasta 8 horas. La infestación ocurre primero en frutos unidos a los arbustos, pero la reproducción y oviposición puede continuar en los cerezos que posteriormente caen al

suelo, incluso un cerezo sano caído al suelo puede ser atacado por broca. En el interior del fruto se cumple todo el ciclo biológico del insecto (De Kraker, 1988; Sotomayor & Duicela, 1993).

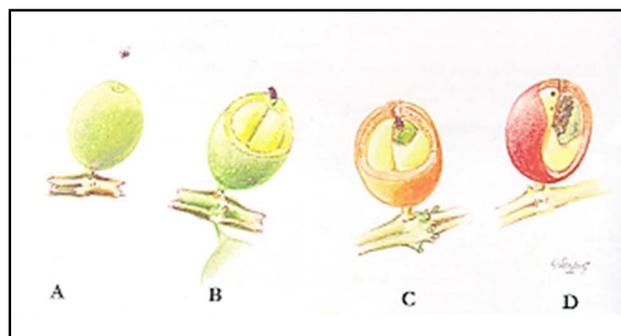


Figura 2. Posicionamiento de *Hypothenemus hampei* según estado de maduración del fruto; a. búsqueda de frutos; b. inicio de perforación al fruto; c. inicio de perforación del endospermo; d. inicio de reproducción en el fruto.

Fuente: Camilo *et al.* (2003).

Investigaciones sobre el tiempo que una hembra tarda en penetrar un fruto, señalan que es variable según el estado de desarrollo del fruto: frutos verdes 5 horas 36 minutos, frutos pintones 5 horas 54 minutos, frutos maduros 4 horas 50 minutos y frutos secos 11 horas 21 minutos. Lo que indica que la broca penetra con mayor rapidez a frutos maduros (Bustillo, 2002).

Visiblemente en un fruto pueden encontrarse de 1 a 8 perforaciones, y aproximadamente de dos a cuatro generaciones de *H. hampei* pueden atacar a un fruto del cafeto desde el momento en que se vuelve vulnerable; el insecto puede permanecer durante todo su ciclo vital en el interior del fruto atacando el grano y cuidando su progenie (Posada-Flores & Pava, 2009).

2.1.9. Fenología del cafeto en relación con la broca

El árbol de cafeto presenta dos períodos definidos de floraciones durante el año, correspondientes a la cosecha principal del segundo semestre, que va desde principios de

septiembre hasta finales de noviembre, y a la cosecha del primer semestre, que va de mediados de marzo a finales de mayo (Bustillo, 2006).

Un estudio de Salazar *et al.* (1993), sobre el desarrollo del fruto del café demuestra que entre la florescencia y el fruto maduro transcurren 32 semanas, esto depende principalmente de la altura a la que se encuentre el cafetal; a más altura, más lento el desarrollo del fruto.

Generalmente un fruto de café suele ser susceptible al ataque de broca cuando su peso seco es cercano o mayor a un 27%, lo cual se logra cuando el fruto alcanza más de 150 días de desarrollo (Bustillo, 2002).

En su investigación Lezaun (2016), corrobora esta teoría al mencionar que el momento apto en el cual la broca puede instalarse en el fruto y servir de alimento para su progenie ocurre a los 119 días post floración cuando su peso seco es igual o mayor al 20%, mientras que Cova *et al.* (2009), señalan que la broca puede atacar los frutos desde 70 días después de la floración, pero cuando el fruto tiene más del 20% de peso seco, lo encuentra apto para iniciar su reproducción.

H. hampei es capaz de atacar a frutos verdes, maduros, sobremaduros, secos e incluso a frutos caídos en el suelo, prefiriendo atacar a los frutos en el siguiente orden: frutos sobremaduros (negros), frutos rojos y por último frutos verdes.

Bustillo *et al.* (1996) señalan que, en cafetales situados a una altura por debajo de los 1000 m.s.n.m., los ataques por broca son más severos, además de preferir ambientes sombríos y de alta humedad para su reproducción. Se ha comprobado que en ambientes de humedad menor al 50% HR la mortalidad de este insecto aumenta. La precipitación está directamente relacionada con la humedad; en zonas húmedas en donde la lluvia abastece prácticamente todo el año, la presencia

de frutos es casi incesante por ende mayormente vulnerables a ataques de broca, dando paso al aumento de la plaga (Duicela *et al.*, 2001).

2.1.10. Daños que provoca

H. hampei ocasiona la caída de frutos verdes y maduros y causa una reducción en el rendimiento y la calidad del producto final, debido al ataque en el interior del grano del café para alimentación del adulto y su progenie; la cosecha puede ser destruida hasta en un 30% y 80% (Bustillo, 2006).

En su investigación Le Pelley (1968) señala que, cuando un grano no es adecuado para la reproducción, la hembra de *H. hampei* a menudo realiza intentos fallidos de perforar el cerezo causando caídas prematuras, desarrollo detenido o descomposición del grano.

Por su parte Lazo (1990), menciona que cuando la broca ataca frutos de dos meses de edad, más del 50% de los frutos afectados caen de las ramas; pero si el ataque ocurre después de los tres meses de edad, la caída de frutos es menor al 23,5%.

Cuando el grano es atestado por una broca se vuelve vulnerable al ataque de otras plagas e infecciones secundarias por hongos y bacterias. Sponagel (1994), señala a dos especies de bacterias, *Erwinia stewartii* (Smith) y *E. salicis* (Day) Chester (Enterobacteriaceae) como responsables de la pudrición húmeda del mesocarpio de frutos inmaduros atacados superficialmente por *H. hampei*.

Erwinia stewartii también ha sido encontrada en el exoesqueleto del escolítido, lo que implica que la broca puede ser vector de propagación de agentes infecciosos secundarios y las pérdidas posteriores resultantes de sus propias actividades fallidas en granos inmaduros.

Varios organismos patógenos y saprófitos fueron encontrados en el grano y semilla infestadas por *H. hampei*, incluidos *Acremonium* sp., *Bacillus* sp., *Erwinia herbicola* (Löhnis) Dye y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Moniliales: Tuberculariaceae) (Damon, 2000; Salazar *et al.*, 1993).

2.1.11. Control biológico de *Hypothenemus hampei*

Naturalmente todas las especies vivientes son atacadas por enemigos naturales, parásitos, predadores o patógenos para alimentarse de una forma u otra. La acción natural y directa de estos individuos sobre un determinado organismo se denomina control biológico; cuando se pierde el equilibrio de la población de un organismo se da paso al surgimiento de una plaga, esto sucede cuando en un ecosistema no se encuentran presentes enemigos naturales que regulen su población, ya sea por introducción del organismo en un ecosistema ajeno o incremento masivo en el número de individuos debido a plaguicidas (Gonzales & Miranda, 2017).

Según Nicholls (2008), el control biológico es el uso de organismos benéficos o enemigos naturales para controlar o reducir la densidad de un organismo que causa daño al hombre.

El control biológico es un fenómeno natural y depende de la densidad de la población de una plaga, ya que se basa en el aumento de intensidad del enemigo natural para destruir la mayor parte de la población de la plaga a medida que esta aumenta; de esta manera se convierte en un control autosostenido y en una estrategia para la restauración de la biodiversidad del ecosistema (DeBach & Rosen, 1991).

Estos autores también indican que cualquier organismo que se alimenta de otro organismo es considerado como enemigo natural. En el control biológico de insectos se distinguen diversos tipos de organismos que ejercen el rol de enemigos naturales, estos pueden ser de tipo

entomopatógenos como virus, bacterias, hongos, nemátodos, entre otros (Gonzales & Miranda, 2017). El control biológico de insectos genera una alternativa efectiva, duradera y económica debido a su sostenibilidad y su mínimo impacto al ambiente.

H. hampei ha sido asociada con varios enemigos naturales que permanecen en su hábitat, entre ellos los parasitoides originarios de África *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyilidae), *Heterosphilus coffeicola* (Hymenoptera: Braconidae), *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae), de los cuales dos especies se han introducido en Ecuador y han sido reportados atacando a los estadios de larva, pupa y adulto y, los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, atacando mayoritariamente a la fase adulta (Le Pelley, 1968; Duicela *et al.*, 2001).

2.1.11. Control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos

Los hongos representan al segundo reino más abundante del planeta, por detrás de los insectos; se encuentran alrededor de todo el mundo y participan en diversos procesos biológicos, con un papel indispensable en el desarrollo de la vida terrestre, dinámica de los ecosistemas y conserva de la biodiversidad (Allendes, 2007).

Según Bastida *et al.* (2015), el término entomopatógeno se refiere a aquellos microorganismos (bacterias, hongos, nemátodos y virus) que tienen la habilidad de atacar a insectos, controlar su población y reducir el daño que puedan ocasionar al hombre.

Nava *et al.* (2012), mencionan a los hongos entomopatógenos como efectivos bioplaguicidas y biocontroladores de poblaciones de insectos, mientras que Allendes (2007), los define como patógenos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia, especificidad y capacidad de penetración directa en el tegumento del organismo viviente (ver

Figura 3). Una investigación de García *et al.* (2008), señalan que prácticamente todos los insectos son vulnerables al ataque de un hongo entomopatógeno, incluyendo a los dípteros, es por eso por lo que los clasifican como uno de los grupos más importantes en el rol de controladores biológicos de insectos.

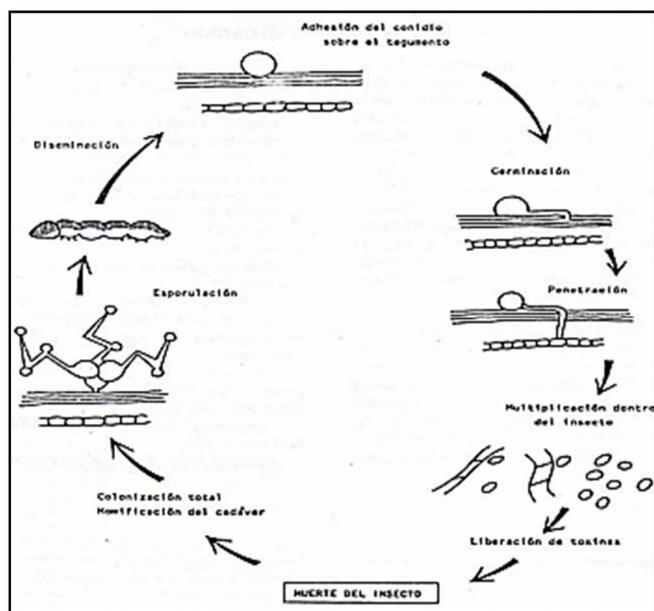


Figura 3. Etapas del Desarrollo de los hongos entomopatógenos

Fuente: Arias (2007).

Los hongos entomopatógenos pertenecen a la división Eumycota, encontrándose en las subdivisiones Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota, y fueron descubiertos por los chinos en el gusano seda y en la cigarra, hace aproximadamente dos milenios. En 1836, Agostino Bassi descubrió que el agente causal de la muscardina en el gusano de seda se trataba de un hongo, hito que despertó el interés de los investigadores acerca del uso hongos entomopatógenos como agentes perjudiciales sobre insectos (García *et al.*, 2008).

Con el pasar de los años y el desarrollo de investigaciones en entomología se han descubierto más de 100 géneros y cerca de 750 especies de hongos entomopatógenos. Entre los más importantes destacan los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Morocco, 2018), mientras que Téllez-Jurado *et al.* (2009) mencionan a *Metarhizium anisopliae* (33,9%), *Beauveria bassiana* (33,9%), *Isaria fumosorosea* (5,8%) y *Beauveria brongniartii* (4,1%) como los hongos entomopatógenos más utilizados a nivel mundial.

Martínez & Ojeda (2017), señalan a *Beauveria bassiana* como valioso controlador de *Hypothenemus hampei* ya que se ha encontrado causando mortalidad de hasta el 50% de la población total en un cafetal infectado por este hongo, y en su investigación de laboratorio Gerónimo *et al.* (2016), señalan que *Beauveria bassiana* causó 100% de mortalidad en *Hypothenemus hampei* después de 144 horas contacto con el hongo.

2.2. *Beauveria bassiana*

2.2.1. Origen y distribución geográfica

Un estudio de De Haro (2013), señala que *Beauveria bassiana* fue descubierto en 1834 por el entomólogo italiano Agostino Bassi cuando observó por primera vez la enfermedad de la muscardina blanca en el gusano de seda (*Bombix mori*); como menciona Yanez (2016), esta enfermedad causaba en el insecto su muerte repentina, además el no identificado patógeno podía ser transmitido por contacto y su crecimiento se veía favorecido por condiciones ambientales tales como humedad y clima cálido.

El patógeno fue nombrado inicialmente como *Botrytis bassiana* en 1835 por Balsamo Crivel y posteriormente, en 1912 Paul Vuillemin lo catalogó en su clase actual. Gracias a

investigaciones enzimáticas se distinguieron otras especies de *Beauveria* y dado este hecho se nombró al género como *Beauveria* spp. encontrándose seis especies: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* y *B. caledonica* principalmente (Glare & Inwood, 1998; Franqui & Medina Gaud, 2003). Según Capek & Fassatiová (1977), las especies *B. bassiana*, y *B. brongniartii* son de carácter entomopatógeno.

En su investigación El Husseini (2019), menciona a *Beauveria bassiana* como un hongo proveniente de los suelos, mientras que Batista *et al.* (2002), señalan que este hongo se encuentra ampliamente distribuido en regiones de todo el mundo formado parte de la microbiota natural del suelo y de sustratos, pudiendo aislarse de insectos, ácaros y tierra.

Estudios de CABI (2018), corroboran lo antes mencionado, señalando que *Beauveria bassiana* se encuentra presente en suelos de los cinco continentes, incluyendo suelos de la región ecuatoriana, atacando a todos los estados de insectos dependiendo de la especie.

2.2.2. Taxonomía

En su estudio Castillo *et al.* (2012), señalan que *Beauveria bassiana*, de acuerdo con su morfología conidial o bien llamada estructura reproductora, pertenece a la subdivisión Deuteromycetes ubicándose así en la clasificación de hongos superiores o imperfectos dada la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 2. Taxonomía de *Beauveria bassiana*

Reino	Fungi
División	Amastigomicotina
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycete
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Genero	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin

Fuente: Noboa & Quelal (2015)

2.2.3. Hospederos

El hongo *Beauveria bassiana* es considerado como uno de los patógenos de insectos más importantes dada su capacidad de infectar a un sinnúmero de especies. Doolotkeldieva *et al.* (2019), indican que su rango de huéspedes oscila alrededor de 700 especies de invertebrados. Este hongo es mundialmente identificado por causar la enfermedad de la muscardina blanca y es común encontrarlo en restos de insectos cubiertos por pequeña capa de aspecto algodonoso color blanco (Castillo *et al.*, 2012).

Bajo determinadas condiciones climáticas, este hongo se encuentra causando epizootias de carácter natural en poblaciones insectos, observándose en algunas especies como el gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*), picudo del banano (*Cosmopolites sordidus*), broca del café (*Hypothenemus hampei*), chinche verde (*Nezara viridula*), barrenador del tallo de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), barrenador del tallo del plátano (*Castnia licus*) (Batista *et al.*, 2002), y otras plagas importantes de la región ecuatoriana.

2.2.4. Morfología

Se describe a continuación las características macroscópicas y microscópicas de *B. bassiana*, según la reseña de varios autores.

2.2.4.1. Características macroscópicas

A simple vista, las colonias de *Beauveria bassiana* se presentan como un algodón blanco al principio y luego se tornan de color amarillento o rosa pálido; con el pasar de los días la colonia toma un aspecto polvoriento color crema. En un huésped, el micelio crece emergiendo en el exoesqueleto para formar una cubierta algodonosa de color blanco en la superficie (Capek & Fassatiová, 1977).

Las colonias *in vitro* de *Beauveria bassiana* comprenden un diámetro de 6 a 23 mm por un alto de 5 mm en aproximadamente ocho días, se visualizan de aspecto lanoso, flocoso, aterciopelado o polvoriento y raramente se forman sinemas. Inicialmente, la colonia se presenta de color blanco, volviéndose con el pasar de los días de color amarillento y de vez en cuando rojizo. El reverso de la colonia varía de color crema a rosado hasta un aspecto pálido a amarillento y de aspecto exudado; no existe olor (El Husseini, 2019).

2.2.4.2. Características microscópicas

Microscópicamente *Beauveria bassiana* presenta una estructura propia de su especie; sus hifas sumergidas generalmente son hialinas y septadas con paredes lisas de 1.5 a 3 μm de ancho; las hifas del micelio aéreo son hialinas, de paredes lisas y de 1 a 2 μm de ancho, de carácter rastrero o erecto y de ellas se desprenden un grupo de células laterales inflamadas, en su mayoría de 3 a 6

x 3 a 5 μm , que al ramificarse dan lugar a unas células más pequeñas e inflamadas llamadas células conidiógenas.

En aislamientos frescos el aparato conidial aparece fuertemente agrupado mientras que en cepas más viejas se encuentra menos compactado. Las células conidiógenas se presentan en grupos pequeños o en solitario, generalmente de 1 a 5 células, en forma elipsoidal a subcilíndrica, con un tamaño de 15 x 6 μm , éstas pueden desprenderse directamente de las hifas.

Las células conidiógenas tienen forma de matraz y su parte basal es de forma globosa, ocasionalmente alargada de un tamaño de 3 a 6 x 2.5 a 3.5 μm ; de ellas se desprende un raquis bien diferenciado en forma de “zigzag” de hasta 20 μm de largo x 1 μm de ancho el cual se encuentra unido a unas células terminales llamadas conidias que generalmente son más delgadas. Las conidias son hialinas, de aspecto globoso o elipsoidal, ocasionalmente con una base apiculada y de un tamaño que varía de 1.5 a 3 μm (Hoog, 1972). Humber (2005) describe a las conidias de aspecto globoso o subgloboso en forma de racimo de 1.5 a 3.5 μm de diámetro. No se forman clamidosporas. En la figura 4 se muestran las distintas estructuras microscópicas de *B. bassiana*.

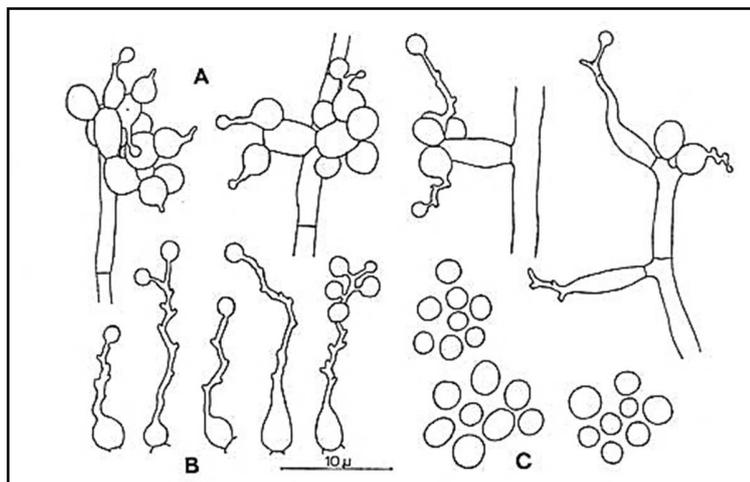


Figura 4. Estructura de *Beauveria bassiana*; a. aparato conidial; b. células conidiógenas; c. conidias

Fuente: Hoog (1972).

2.2.5. Condiciones de crecimiento

Cuando existen condiciones ambientales favorables como alta humedad relativa, temperatura, una abundante población del insecto, radiación y sombra, se observan niveles importantes de epizootias causadas por *B. bassiana*; estudios demuestran que se puede tener mortalidades de broca hasta de un 80% bajo condiciones de humedad y sombrío adecuadas; pero bajo condiciones no favorables su eficacia se puede reducir a niveles del 20% a 30% (Arias, 2007).

Una cepa de *Beauveria bassiana* necesita las siguientes condiciones de crecimiento para su óptimo desarrollo:

Tabla 3. Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Factor	Descripción
pH	Entre 5.7 y 5.9
Temperatura	Óptima entre 25 y 28°C; límites entre 8 y 35°C.
Humedad	Óptima al 94%; límites entre 34 y 100% según la temperatura.
Necesidad nutricional	Fuentes de nitrógeno como la peptona y fuentes de energía como sacarosa, glucosa, almidón, pectina.

Fuente: Noboa & Quelal (2015); Fargues *et al.* (1997).

2.2.6. Mecanismo patogénico

El mecanismo de acción de *B. bassiana*, así como de otros hongos entomopatógenos, se da por contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el insecto; ocurre al azar mediante factores que determinan la activación de la infección como clima favorable, polución del entomopatógeno en el ambiente y cantidad de hospederos existentes (Bastida *et al.*, 2015); De Haro (2013), señala que este ciclo comprende tres fases generales: adhesión y germinación de la spora en la cutícula del hospedero, penetración en el hemocele y desarrollo del hongo (ver Figura 5). La mayoría de las veces, el insecto muere luego de la culminación de la infección.

Como menciona Bustillo (2001), la germinación de las conidias de *B. bassiana* se da en un lapso de 12 horas después de la inoculación y, al cabo de 72 horas de la inoculación, el insecto está totalmente colonizado.

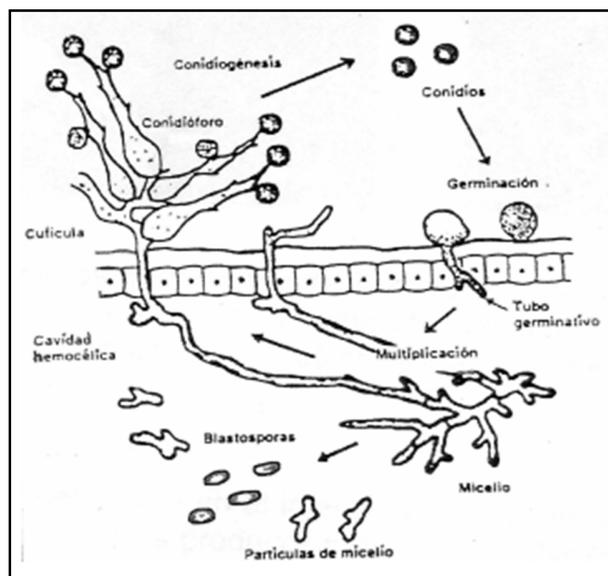


Figura 5. Ciclo de infección de *Beauveria bassiana* sobre un insecto

Fuente: Arias (2007).

2.2.6.1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del hospedero

Para iniciar el ciclo infeccioso, es necesaria la retención por contacto de las esporas del entomopatógeno en la superficie del insecto. Cuando esto ocurre, las esporas se adhieren al integumento mediante una molécula llamada adhesina e inicia la relación patógeno-hospedero. Por otro lado, está demostrado que iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} son intervinientes en el proceso de invasión del hospedero. La espora comienza su activación y germinación en presencia de humedad (aprox. 70%) y de carbohidratos presentes en la cutícula del insecto. La acción antidesecante de la cubierta mucilaginosa del hospedero favorece a la constante hidratación de la espora adherida, además este fenómeno inicial funciona como protector ante el sistema inmune del insecto que se activa inmediatamente secretando polifenoles tóxicos y enzimas (Wraight & Ramos, 2017).

2.2.6.2. Penetración en el hemocele

La investigación de Morocco (2018), señala que al comenzar la germinación se desarrolla una estructura hifal, denominada tubo germinativo. Este proceso depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, esclerotización y presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. Bustillo (2001), indica que la penetración puede ocurrir también a través de la cavidad bucal del insecto, (proceso que es favorecido por la humedad existente en el tracto alimenticio), ano, sifón respiratorio, espiráculos y tarsos.

El tubo germinativo penetra la cutícula del hospedero mediante procesos mecánicos y enzimáticos. En primer lugar, ocurre la ruptura de la capa cuticular del insecto debido a la deformación y debilitación de ésta, proceso que es ocasionado por una estructura fúngica llamada haustorio la cual ejerce presión en la cutícula de la víctima hasta provocar su ruptura; a continuación, se produce la degradación del tejido de la zona en donde penetra el tubo germinativo facilitando la entrada del hongo en el cuerpo del insecto; este proceso se da mediante la reacción entre enzimas hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, quitinasas y ácido oxálico presentes en el hongo (Bastida *et al.*, 2015; Wraight & Ramos, 2017).

2.2.6.3. Desarrollo del hongo

Generalmente la penetración en el hemocele es un proceso rápido. Aquí el hongo convierte su crecimiento micelial en fase de levadura y una vez evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia ocasionada por la formación de cuerpos hifales secundarios que invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, entre otras (Pucheta *et al.*, 2006).

Según el estudio de CABI (2018), se ha demostrado que el proceso de penetración desde la cutícula hasta el hemocele es favorecedor, ya que la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos, proceso que contribuye la nutrición y crecimiento del hongo.

A su vez, Téllez-Jurado *et al.* (2009), refieren que cuando ha ocurrido la penetración y el hongo se encuentra en el interior del insecto, debe enfrentarse al sistema inmunitario de éste, produciendo toxinas o cambios estructurales en su pared celular; *B. bassiana* secreta sustancias tóxicas tales como beauvericina, beauverólidos y basianólidos, que destruyen por completo el sistema del insecto causando convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis (Pucheta *et al.*, 2006).

Como mencionan Nava *et al.* (2012), al final el insecto muere por causa del daño físico de los tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes, mientras que Glare & Inwood (1998), añaden que algunas veces y dependiendo de la capacidad de infección del hongo, se producen suficientes toxinas para causar la muerte del insecto antes de que los órganos estén invadidos. Este proceso es llamado muerte por toxicidad.

Cuando el hospedero fallece, *B. bassiana* continúa su crecimiento dispersándose a través de todos los tejidos del insecto y compitiendo con la flora bacteriana del mismo. En esta etapa se observa que el cadáver toma una coloración característica roja, producida por la oosporeina, una sustancia antibiótica propia de la secreción de *B. bassiana*. A continuación, el cadáver queda totalmente momificado y cubierto por el micelio del hongo (Noboa & Quelal, 2015).

Finalmente, para que el hongo emerja al exterior y produzca inóculo para otros insectos, deben existir condiciones favorables tales como alta humedad. Cuando las condiciones son

adversas, el hongo permanece dentro del cadáver sobreviviendo durante un tiempo y ocasionalmente producirá esporas cuando las condiciones sean nuevamente favorables (Morocco, 2018).

2.2.7. *Beauveria bassiana* en relación con *Hypothenemus hampei*

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se encuentra infectando naturalmente a la broca en casi todas las regiones en donde el insecto esté presente; este microorganismo es capaz de infectar a las fases de larva, pupa y adulto de un insecto broca (Arboleda *et al.*, 2003).

Una investigación de Arcila *et al.* (2006), en cuanto a la eficiencia de *B. bassiana* sobre el control de la broca, corrobora la teoría Arias (2007), de señalar a la humedad, sombra y radiación como factores imprescindibles para el desarrollo del hongo. En la investigación se demostró que hubo una mayor mortalidad en brocas presentes en ramas bajas, probablemente debido a la presencia de mayor humedad y de menor radiación solar, además de la eficacia en el ataque que *B. bassiana* presentó en cafetales expuestos a la sombra.

Un cadáver de broca bien esporulado puede llegar a producir hasta 10 millones de esporas, lo que facilita su dispersión y establecimiento en los cafetales. En campo, se observa a *B. bassiana* como una mota de algodón o moho blanco sobre el cuerpo del insecto. La manifestación del hongo inicia en las suturas intersegmentales y luego sobre todo el cuerpo. Posteriormente se observa la formación de los conidióforos y de las conidias lo que es altamente dependiente de condiciones de alta humedad. Finalmente se observa el desprendimiento de conidias caracterizado por un aspecto pulverulento (Martínez & Ojeda, 2017).

B. bassiana ataca la broca cuando se encuentra en fase de perforación del disco del grano de café, al entrar en contacto con sus esporas; una vez que el insecto haya entrado al fruto es difícil

para el hongo realizar el proceso de infección. El ciclo de vida de *B. bassiana* sobre la broca bajo condiciones de laboratorio, se completa en promedio en 8,2 días desde la inoculación hasta el desprendimiento de las esporas. En el campo y según las condiciones ambientales, puede tomar entre 15 a 30 días (Bustillo & Posada, 1996).

Un estudio de Arrubla *et al.* (2008), en cuanto a la afinidad del hongo sobre la broca del café, refiere que las esporas de *B. bassiana*, se encuentran más disponibles a adherirse a la cutícula del insecto, debido a la misma constitución hidrofóbica entre las partes, lo que facilita el complejo espora - insecto

2.3. Métodos utilizados en la fase experimental

2.3.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una fórmula sólida o líquida que permite el desarrollo *in vitro* de un microorganismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes y condiciones adecuadas para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, pH adecuado, etc.). El medio de cultivo comúnmente utilizado para el aislamiento de hongos como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium* es el Potato Dextrose Agar (PDA) (Cañedo & Ames, 2004).

2.3.2. Aislamiento de hongos

El aislamiento consiste en la obtención del hongo a partir de una fuente de inóculo primario, tal como un insecto, planta, muestra de suelo o un medio de cultivo artificial, para su posterior siembra en un medio de crecimiento enriquecido (Arrubla *et al.*, 2008).

El aislamiento de hongos entomopatógenos puede realizarse de dos maneras: por dilución seriada y directa. En la presente investigación se utiliza el método de aislamiento directo.

2.3.2.1. Método de aislamiento directo

Este método consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto o de la superficie donde se encuentre, para posteriormente inocularlo en un medio nutritivo como PDA o SDA e incubarlo a una temperatura y tiempo adecuados. El aislamiento directo puede realizarse de formas: raspando con un asa bacteriológica estéril las partículas del hongo de un insecto desinfectado y pasándola a un medio nutritivo o, mediante la agitación del insecto esporulado desinfectado sobre la superficie de un medio de cultivo (Monzón, 2001).

2.3.3. Purificación de aislamientos

La purificación de un aislamiento se refiere a que en un medio nutritivo se encuentra exclusivamente el hongo objetivo, sin presencia de contaminantes. Para obtener cultivos puros se realiza un reaislamiento del hongo a partir del cultivo madre o cultivo primario. Existe un método para obtener cultivos aún más puros, que se desarrollan a partir de una sola espora (Cañizalez *et al.*, 2015); este método se utiliza en la presente investigación y se conoce como cultivo monospórico.

2.3.3.1. Cultivo Monospórico

Uno de los problemas más comunes al aislar es la contaminación por bacterias y levaduras; para establecer una colección confiable, es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de un hongo, además el uso de aislamientos fúngicos obtenidos a partir de una sola espora es fundamental para la identificación y caracterización de muchas especies, sin riesgo de confusión entre claves taxonómicas (Choi *et al.*, 1999). Según Cañedo & Ames (2004), los cultivos monospóricos pueden realizarse mediante aislamiento por colonia o punta de hifa; ambos provenientes de una sola espora.

2.3.4. Caracterización biológica

Cuando se cultivan microorganismos sobre medios de cultivo sólidos, las células aisladas se multiplican masivamente hasta dar un crecimiento visible conocido con el nombre de colonia, las características de estas colonias son estudiadas a nivel macro y microscópico y se usan para la identificación de las especies en comparación con claves taxonómicas; adicionalmente se pueden realizar distintas pruebas que permitan determinar su calidad de desarrollo, tales como evaluación de la velocidad de crecimiento y tasa diaria de crecimiento radial del micelio o evaluación del porcentaje de germinación del hongo (Arcila *et al.*, 2006; Pedrique & Gutierrez, 2001).

2.3.5. Determinación de la tasa de mortalidad de insectos

En un ensayo, donde una sustancia resulte tóxica para un cierto número de individuos en una población, es necesario realizar algunos cálculos como la determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) (Bravo, 2019).

La Dosis Letal Media (DL₅₀) se define como la dosis que produce el 50 % de mortalidad en una población. Esta prueba se utiliza para encontrar el umbral de toxicidad que provoca una sustancia; en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos ante ciertos biocidas (Córdova, 2012).

Existen algunos cálculos equivalentes que se añaden a la presente investigación e indican eficacia o susceptibilidad en variables del diseño experimental, tales como TL₅₀ que se refiere al tiempo que tarda en morir el 50 % de la población ante la exposición a una sustancia tóxica, CL₅₀ que define la muerte del 50% de los animales y la CL₉₀ referida a la concentración que provoca la muerte del 90% de los animales (Nereida, 2016).

Según Rivero *et al.* (2016), para determinar el porcentaje de mortalidad de los insectos se corrigen los datos mediante la fórmula propuesta por Abbott.

$$\%M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} * 100$$

Donde,

M = mortalidad

m_e = mortalidad en el extracto

m_b = mortalidad en el blanco

Reemplazando

$$m_e = \frac{r}{n}; \quad m_b = \frac{r'}{n}$$

Donde,

r = insectos muertos en el extracto

r' = insectos muertos en el blanco

n = número de individuos

2.3.6. Análisis estadístico de Probit

Para determinar factores de mortalidad a través de la ecuación de regresión se utiliza el análisis estadístico de Probit. Según Nereida (2016), la estimación de la eficacia de toxicidad de una sustancia debe estar sustentada en base a un diseño experimental apropiado y los resultados de este deben ser analizados con métodos estadísticos específicos como el análisis Probit, por su parte Córdova (2012), corrobora esta teoría al mencionar que para el cálculo de la DL_{50} , TL_{50} y CL_{50} generalmente se usa el análisis Probit, mismo que permite encontrar estimadores de respuesta para ensayos biológicos cuantiales, analizando porcentajes de efecto vs. dosis o tiempo de exposición dentro de un marco de regresión.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Características del lugar de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología I, perteneciente a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca con coordenadas 2°53'12.8"S 78°59'26.3"O a 2532 m.s.n.m.

3.2. Metodología

La parte experimental se realizó en dos fases: fase de campo, donde se recolectaron los especímenes de *Hypothenemus hampei* y *Beauveria bassiana*, y fase de laboratorio, donde se realizaron los protocolos de caracterización y cría de la broca del café; aislamiento, purificación, y prueba de patogenicidad del hongo sobre el insecto.

3.2.1. Fase de campo

3.2.1.1. Recolección del hongo *Beauveria bassiana* y de la broca del café *Hypothenemus hampei*

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y los especímenes de broca del café (*Hypothenemus hampei*) se obtuvieron de frutos de cafetales (*Coffea arabica*) situados en la finca municipal "El Molino", ubicada en la parroquia Salvias, cantón Zaruma, provincia de El Oro, con coordenadas 3°37'50"S 79°32'46"O a 1169 m.s.n.m y temperatura de 26°C (ver Figura 6).



Figura 6. Lugar de muestreo de *Beauveria bassiana* e *Hypothenemus hampei*.

Fuente: Google Maps (2019).

Se recorrió la finca y se seleccionaron al azar los frutos del cafetal que presentaban en el disco o corona un pequeño orificio creado por la broca, además de manifestarse en esta perforación un característico crecimiento fungoso de color blanco propio de *Beauveria bassiana* (ver Anexo 2); cabe recalcar que no todos los frutos presentaron presencia del hongo, pero se seleccionaron aquellos que efectivamente indicaban ataque por broca. Los granos tenían un tiempo de desarrollo de 100 días aproximadamente, y se encontraban en estado inmaduro

Dichos frutos se extrajeron de la planta, se colocaron en botellas viales previamente lavadas con agua, sellando el orificio de entrada con tela tul para permitir el paso de oxígeno y se trasladaron a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.2.2. Fase de laboratorio

Todas las etapas de la fase de laboratorio se realizaron sobre equipos y superficies totalmente desinfectadas para evitar contaminación y obtener cultivos puros desde el inicio.

3.2.2.1. Caracterización biológica y cría de *Hypothenemus hampei*

Para la confirmación de especie, las diferentes estructuras de los adultos de *H. hampei* colectados, se observaron en un estereoscopio y se compararon con las claves taxonómicas propuestas por Constantino *et al.* (2011) e ICA (2020) (ver Anexo 3). Para la cría de estos insectos se utilizó una cámara bioclimática (ver Anexo 2) la cual se mantuvo a una temperatura aproximada de 26°C. Se utilizaron, además, granos semimaduros de café arábica (*Coffea arabica*) como sustrato alimenticio.

3.2.2.2. Aislamiento del hongo *Beauveria bassiana* a partir de granos infectados

Esta actividad utilizó la metodología propuesta por Monzón (2001) con algunas modificaciones descritas por Doolotkeldieva *et al.* (2019).

De los granos de café colectados, se seleccionaron aquellos que presentaron un característico crecimiento fungoso de color blanco en el disco o corona; cada grano se desinfectó en hipoclorito de sodio al 1% (ver Anexo 2) durante 3 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Para eliminar restos de humedad, se colocaron los especímenes sobre papel filtro estéril.

Mediante la técnica de aislamiento directo y con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, se raspó el micelio del hongo de cada grano, mismo que se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA + cloranfenicol 0.5 g/L, previamente esterilizado en autoclave a 121°C, 15 lbs de

presión durante 15 minutos. Las cajas Petri se sellaron con cinta Parafilm, se rotularon y se dejaron en incubación con ausencia de luz, a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 60% durante 7 días.

3.2.2.3. Purificación del hongo *Beauveria bassiana*

Seis días después de incubación del cultivo madre, se realizó su resiembra para obtención de una generación aún más pura siguiendo la metodología descrita por Monzón (2001).

Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, se tomó una muestra de micelio y se resembró en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio PDA previamente esterilizado en autoclave a 121°C , 15 lbs de presión durante 15 minutos. Estos se sellaron con cinta Parafilm, se rotularon y se dejaron en incubación con ausencia de luz, a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

Para establecer una colección confiable, y para que el hongo tenga una actividad eficaz de virulencia, se obtuvo el cultivo monospórico del reaislamiento, según la metodología propuesta por Choi *et al.* (1999).

Se preparó una solución de esporas primaria a partir de la última resiembra adicionando 10 mL de suero fisiológico estéril. Esta suspensión se agitó manualmente durante 1 minuto para facilitar el desprendimiento de las esporas.

Se prepararon varias cajas Petri con medio PDA estéril y en su parte inferior, se marcaron cuadrados de 1 cm^2 aproximadamente (ver Anexo 4); seguidamente con ayuda de una micropipeta se transfirió la suspensión de esporas al medio de cultivo, colocando 100 uL en cada uno de los cuadrillos marcados y se incubaron sin sellar a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 12 a 24 horas, controlando periódicamente en el estereoscopio la germinación de esporas.

Cuando se observaron alrededor de 10 esporas germinadas, se traspasaron a dos cajas petri con medio PDA estéril y se incubaron a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta notar una desarrollada colonia con un diámetro de 1 a 2 cm aproximadamente.

Posteriormente, se cortó la periferia de cada micelio, incluyendo al medio de cultivo, y se sembró en una nueva caja Petri con medio PDA estéril; finalmente se incubó a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días y se obtuvo un cultivo puro.

3.2.2.4. Caracterización biológica de *Beauveria bassiana*

Para la confirmación de especie del aislado fúngico purificado se realizaron dos pruebas específicas: caracterización macroscópica y microscópica, mientras que, para evaluar la capacidad y calidad de crecimiento de este, se realizaron evaluaciones del crecimiento radial y porcentaje de germinación de esporas. Ambas pruebas se compararon con las claves taxonómicas propuestas por Humber (2005) y Hoog (1972).

Caracterización macroscópica

Esta prueba utilizó la metodología de observación descrita por Pedrique & Gutierrez (2001), para evaluación de estructuras macroscópicas de hongos.

Al cuarto y noveno día de incubación del aislamiento monospórico, se observaron a simple vista las características de la colonia tales como coloración, forma, borde, elevación, aspecto general, textura y grado de crecimiento.

Caracterización microscópica

Esta prueba utilizó la metodología propuesta por Cañedo & Ames (2004). Después de 4 y 7 días de incubación del aislamiento monospórico, en una lámina portaobjetos se colocó una gota de azul de lactofenol; con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, se rasó una pequeña parte de

la superficie del micelio, la cual se dispersó sobre la gota de azul de lactofenol a la que seguidamente se le colocó un cubreobjetos. Se observó el ejemplar en un microscopio óptico compuesto, identificando principalmente estructura y tamaño de hifas, células conidiógenas y conidias.

Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR

Para determinar este ensayo, se utilizó la metodología propuesta por Malpartida *et al.* (2013), con algunas modificaciones.

A partir del aislamiento monospórico, en el centro de 3 cajas Petri con medio de cultivo PDA estéril y con ayuda de una micropipeta, se sembraron 10 uL de una concentración ajustada en una cámara de Neubauer (ver Figura 7), de 1×10^8 conidias mL^{-1} del hongo. Todas las cajas petri se sellaron con Parafilm y se mantuvieron en incubación a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 10 días.



Figura 7. Cámara de Neubauer utilizada para el conteo de esporas

Fuente: autora

Con una regla milimetrada se midió diariamente el radio del micelio, a partir de su segundo día de desarrollo, y se aplicó la fórmula modificada de Vela *et al.* (2018), para velocidades de crecimiento radial.

$$V = \frac{x \text{ (mm)}}{t \text{ (d)}}$$

Donde,

V = velocidad de crecimiento radial

x (mm) = radio de la colonia en milímetros

t (d) = tiempo en días de ensayo

Para calcular la tasa diaria de crecimiento radial TDCR se promediaron las diferencias de las velocidades de crecimiento radial entre los días de ensayo.

Evaluación del porcentaje de germinación de esporas

Este ensayo utilizó la metodología y cálculos propuestos por Malpartida *et al.* (2013), con algunas modificaciones.

A partir del aislamiento monospórico, en el centro de 3 cajas Petri con medio de cultivo PDA estéril y con ayuda de una micropipeta, se sembraron 5 uL de una concentración ajustada en una cámara de Neubauer de 1×10^4 conidias mL^{-1} del hongo. Las cajas Petri se sellaron con Parafilm y se mantuvieron en incubación a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas; seguidamente, se destaparon y a cada colonia visible se le añadió una gota de azul de lactofenol para detener la germinación. Finalmente, en un microscopio invertido se contabilizaron las conidias germinadas del total de conidias presentes.

El porcentaje de germinación se calculó mediante la fórmula

$$\% G = \frac{N^\circ \text{ conidias germinadas}}{N^\circ \text{ total de conidias}} \times 100$$

Donde,

$\% G$ = Porcentaje de germinación

3.2.2.5. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*

Este bioensayo utilizó la metodología de Gonzáles *et al.* (1993) y Cañizalez *et al.* (2015) con algunas modificaciones propuestas por Palacios (2009), y para corroborar su efectividad se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, en 5 etapas de la siguiente forma:

Las brocas colectadas se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 1 minuto y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril, antes colocarlas sobre papel filtro estéril para absorber excesos de humedad. Se escogieron 50 brocas activas por repetición y se colocaron en grupos de 10 individuos en bolsas viales de tela tul estéril, con un total de 150 brocas activas por ensayo.

Del aislamiento monospórico, se preparó una dilución madre adicionando 10 mL de suero fisiológico estéril. A partir de esta solución se prepararon 4 diferentes diluciones ajustando en una cámara de Neubauer para obtener las concentraciones 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 y 1×10^5 conidias mL^{-1} , mismas que se identificaron como T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Cada dilución se homogenizó levemente para procurar que las esporas no permanezcan en el fondo del tubo de ensayo.

Tabla 4. Tratamiento, número de repetición, concentración del inóculo y número de brocas utilizadas para el bioensayo de patogenicidad.

Tratamiento	Número de repetición	Concentración del inóculo	Número de brocas
T1	3	1×10^8 conidias mL^{-1}	10
T2	3	1×10^7 conidias mL^{-1}	10
T3	3	1×10^6 conidias mL^{-1}	10
T4	3	1×10^5 conidias mL^{-1}	10
T5	3	Testigo (agua estéril)	10

Fuente: autora

Las brocas desinfectadas se inocularon por inmersión durante 1 minuto en 10 mL de cada una de las concentraciones preparadas (T1, T2, T3 y T4). Luego fueron colocadas sobre papel filtro estéril, para eliminar exceso de humedad y trasferidas en grupos de 10 individuos a cajas Petri estériles con división, acondicionadas con un disco de papel filtro en su división derecha (ver Figura 8) para mantener la humedad y 5 granos de café seco (para ralentizar la actividad de perforación de la broca) en su división izquierda, como sustrato alimenticio. Cada caja se tapó y se rotuló con el código de la concentración. Se separó además cada grupo por repetición.



Figura 8. Modelo de viales para el bioensayo de patogenicidad, acondicionados con papel filtro y sustrato alimenticio

Fuente: autora

Para el testigo se emplearon brocas a las que se le aplicó la misma metodología, pero sumergiéndolas únicamente en agua destilada estéril como tratamiento (T5).

Finalmente, los viales se mantuvieron en una cámara bioclimática a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y HR del 60% y se monitorearon durante 6 días para observar la mortalidad y desarrollo del hongo sobre cada individuo.

3.2.3. Evaluación estadística

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, aplicándose 10 insectos por tratamiento, con 3 repeticiones. Los tratamientos fueron las 4 concentraciones y 1 testigo sin aplicación. La mortalidad de los adultos de *H. hampei* se expresó en porcentaje y con los resultados de cada repetición se calculó la mortalidad total. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos en la variabilidad de la variable respuesta, comprobando cuales grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Finalmente se realizó el análisis Probit, para calcular la DL_{50} , CL_{50} y TL_{50} de la población a través de la ecuación de regresión. Se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS Centurion.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización biológica de *Hypothenemus hampei*

A la vista en el estereoscopio, la mayoría de los adultos colectados presentaron color castaño oscuro y en su morfología se visualizaron tres tagmas comunes, cabeza, tórax y abdomen. La cabeza de forma globular se halló escondida dentro de un semiesférico protórax, de la cual se desprendían dos pequeñas antenas con una coyuntura similar a un codo; en los últimos cinco segmentos de estas se visualizó una especie de clava con setas. La hembra, más grande que el macho, de perfil presentó una línea dorsal levemente curvada mientras que en el macho se distinguió un pronunciado arco que comprendía todo el perfil del borde anterior del protórax y la extremidad apical de los élitros. En los dos sexos se hallaron dos pares de alas (élitros) que protegían el abdomen, cubiertos de setas y con rayas paralelas. Únicamente en la hembra se visualizó capacidad de vuelo gracias a la presencia de un segundo par de alas membranosas metatorácicas (ver Anexo 3), destreza que se halló nula en el macho, debido a la ausencia del segundo par de alas; estos rasgos coinciden al pie de la letra con aquellos mencionados por Constantino *et al.* (2011) y al comparar los especímenes con las ilustraciones propuestas por ICA (2020) no se encontró diferencia alguna entre morfologías corroborando sustancialmente la especie.

4.2. Aislamiento de *Beauveria bassiana*

4.2.1. Caracterización macroscópica

A los cuatro días de incubación *in vitro* del hongo a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se observó una pequeña colonia con un aspecto principalmente algodonoso, aterciopelado de color

blanco a rosa pálido, con forma cruciforme a circular y crecimiento rápido; reverso visiblemente liso, color crema pálido y de forma circular; con bordes enteros para ambas caras. Al noveno día de incubación y a temperatura constante se visualizó una colonia circular de gran tamaño, polvorienta y aterciopelada, esto debido a la compactación del aparato conidial (Hoog, 1972); el centro de la colonia se halló de color rosa pálido con bordes blancos, mientras que su reverso fue incoloro sin ninguna diferencia con el paso de los días. Además, se pudo evidenciar que, la mayoría de los aislamientos obtenidos presentaron características macromorfológicas que difieren de algunos autores, tales como la coloración, esto debido a la existencia de variantes entre razas como lo menciona Jiménez (1992); no obstante, las claves taxonómicas que presentan Hoog (1972) y Humber (2005) para cultivos *in vitro* de *Beauveria bassiana*, son comparables con los resultados de la evaluación (Tabla 5) y permiten corroborar la especie. No se encontró ninguna diferencia macroscópica significativa entre aislamientos.

Tabla 5. Características macroscópicas observadas en los aislamientos

Característica colonia	Cuarto día		Noveno día	
	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
Forma	Cruciforme	Cruciforme	Circular	Circular
Color	Blanco Rosa pálido	Crema pálido	Rosa pálido	Incoloro Crema pálido
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Umbilicada		Elevada	
Textura	Algodonosa Aterciopelada	Aterciopelada	Polvorienta Aterciopelada	Aterciopelada
Superficie	Radiada	Lisa	Radiada	Lisa
Grado de crecimiento	Rápido	Rápido	Medio	Medio

Fuente: autora

4.2.2. Caracterización microscópica

Esta evaluación se realizó para corroborar enteramente la especie. Después de siete días de incubación *in vitro* del hongo a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a la vista de su ejemplar por microscopía óptica se observaron las estructuras que Hoog (1972) y Humber (2005) describen como típica característica microscópica de *B. bassiana*.

Principalmente destacaron hifas hialinas, septadas, de paredes lisas con un ancho aproximado de $1.5\ \mu\text{m}$, de las cuales se desprendía un grupo de alargadas células conidiógenas, con forma de botella y base globosa, con un tamaño aproximado de $15\ \mu\text{m}$. En algunas de estas células se visualizó un raquis definido de tipo ziz-zag, el cual es una característica clave para diferenciar entre especies similares a *B. bassiana* según reportes de Hoog (1972). Cabe recalcar la dificultad de observación de este raquis en algunas muestras (ver Anexo 4), probablemente debido a la capacidad de absorción de la tinción de azul de lactofenol por parte de algunas estructuras fúngicas, ya que no se trata de una tinción diferencial según reportes de López *et al.* (2014), a su vez, el estudio de García *et al.* (2011) corrobora esta indagación al mencionar que ciertas estructuras de *B. bassiana* no pudieron ser fácilmente reconocidas por tinción con azul de lactofenol mediante microscopía óptica. En el terminal de las células conidiógenas, se observaron las células de reproducción asexual o conidios (ver Anexo 4), de carácter hialino, globoso y con un tamaño aproximado de 1.7 a $2.1\ \mu\text{m}$ de diámetro coincidiendo exactamente con las claves taxonómicas que los autores manifiestan.

Tabla 6. Características microscópicas observadas en los aislamientos

<i>Beauveria bassiana</i>	Característica microscópica	Aspecto general
Presencia de	Hifas	Hialinas Planas
	Conidióforo	Compuesto Agrupado
	Células conidiógenas	Forma de botella Alargadas
	Raquis	Forma de zig-zag
	Conidios	Globosos

Fuente: autora

4.2.3. Evaluación de la tasa diaria de crecimiento radial TDCR

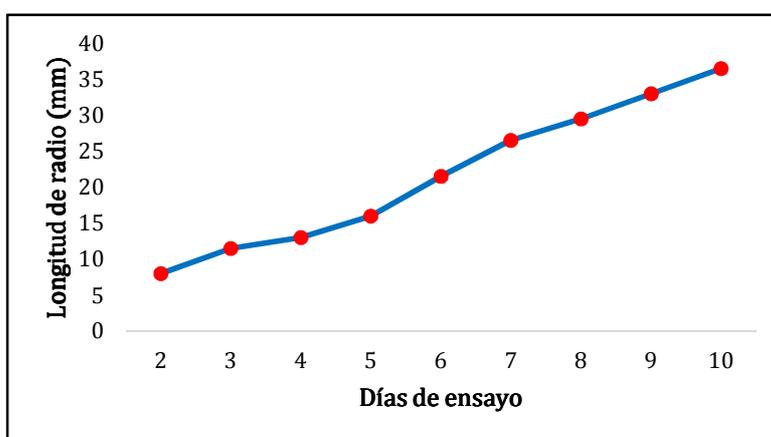
Esta evaluación se realizó para determinar la velocidad de crecimiento de la cepa en medio de cultivo PDA y su calidad al compararla con estudios de otros autores. El crecimiento de las colonias de *B. bassiana* con una concentración inicial de 1×10^8 conidias mL^{-1} fue rápido y homogéneo. A partir del segundo día de incubación del hongo se midieron los radios de las colonias, se promediaron entre las mediciones, se calcularon las velocidades de crecimiento radial diarias y se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 7. Longitud de radio y velocidad de crecimiento radial (concentración 1×10^8 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo

Día	<i>B. bassiana</i>	
	Radio (mm)	Velocidad de crecimiento radial (mm.día^{-1})
2	8	4
3	11,5	3,83
4	13	3,25
5	16	3,2
6	21,5	3,58
7	26,5	3,78
8	29,5	3,68
9	33	3,6
10	36,5	3,64

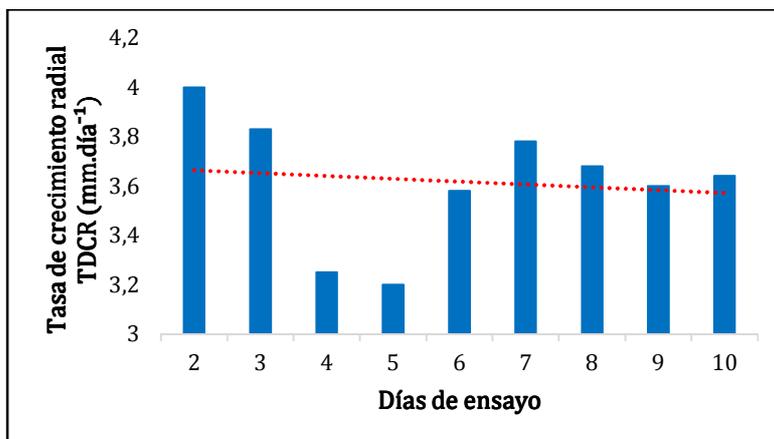
Fuente: autora

Los resultados de la velocidad de crecimiento radial se promediaron entre los días de ensayo y se obtuvo una tasa de crecimiento radial TDCR de $3,61 \text{ mm.día}^{-1}$ (ver Gráfica 2) con una longitud de desarrollo radial de $36,5 \text{ mm}$ al décimo día (ver Gráfica 1), valor no alejado de la TDCR que registra Malpartida *et al.* (2013) de $3,45 \text{ mm.día}^{-1}$ y un desarrollo radial de 35 mm al décimo día; no obstante, los resultados del estudio de Vela *et al.* (2018) reportan una velocidad de crecimiento radial de $2,59 \text{ mm.día}^{-1}$ del hongo en medio PDA, pero considerando que estos autores utilizaron una temperatura de incubación de 22°C y no emplearon la metodología de siembra por concentraciones. Es necesario recalcar que la tasa de crecimiento radial de un hongo según reportes de Espinoza & Vallejos (2016), depende de factores tales como el tipo de cepa utilizada, la condición del sustrato donde este se desarrolla, además de su habilidad para subsistir en ciertas temperaturas, entre otros.



Gráfica 1. Crecimiento radial (concentración 1×10^7 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.

Fuente: autora



Gráfica 2. TDCR (concentración 1×10^8 conidias mL^{-1}) en medio de cultivo PDA, hasta el décimo día de ensayo.

Fuente: autora

4.2.4. Evaluación del porcentaje de germinación de esporas

Esta evaluación se realizó para determinar el porcentaje de germinación de las conidias de *B. bassiana* y su viabilidad de desarrollo en medio de cultivo PDA. La cepa aislada presentó un alto porcentaje de germinación en sus primeras 24 horas, con un promedio de 96,6%, valor que corrobora la viabilidad de las conidias sobre medio de cultivo PDA. Este valor se encuentra dentro del rango establecido por Espinoza & Vallejos (2016), quienes indican que el porcentaje de germinación de *B. bassiana* adecuado para ser aplicado como controlador entomopatógeno no debe ser inferior al 95% las primeras 24 horas, además de mencionar que en observación microscópica deben ser contabilizadas al menos 200 conidias por montaje, coincidiendo con el valor de ejemplares observados en la presente evaluación, de 328 conidias aproximadamente (ver Anexo 4).

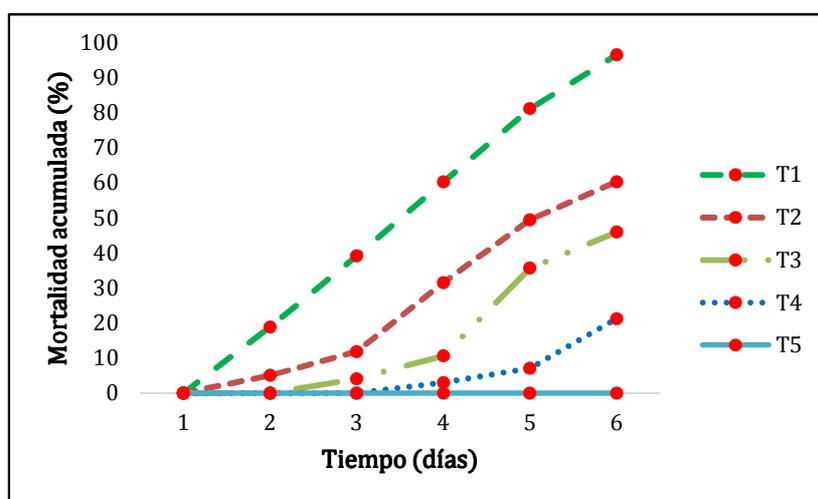
4.3. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*

La actividad biopesticida de *B. bassiana* sobre *H. hampei* fue evaluada hasta el 6to día (144 horas) post aplicación del tratamiento, sin embargo para la obtención de la DL $\square\square$ y demás análisis

estadísticos los tratamientos fueron comparados al 4to día de la inoculación, antes de completar el 100% de mortalidad.

Las diferentes concentraciones del hongo demostraron capacidad toxicológica al entrar en contacto con el cuerpo del insecto destacando a simple vista reducción en la actividad motora y de desplazamiento, además de la reducción en la alimentación y barreno sobre los granos que sirvieron como sustrato alimenticio (ver Anexo 5), actividades que fueron disminuyendo gradualmente con el pasar de los días.

En la gráfica 3 se presentan los resultados generales del bioensayo; cada punto en color rojo representa a la media del porcentaje de mortalidad que provocó cada tratamiento, en relación con los días post inoculación.



Gráfica 3. Mortalidad acumulada de adultos de *H. hampei* con relación a la concentración empleada y los días de ensayo.

Fuente: autora

Según los resultados, la mortalidad en las tres repeticiones fue directamente proporcional a la concentración de conidias, siendo que al 4to día posterior a la inoculación el T1, equivalente a 1×10^8 conidias mL^{-1} , fue el tratamiento de mayor eficacia sobre *H. hampei*, con un 60,33% de

mortalidad el cual llego al 96,66% dos días después; la curva de mortalidad con respecto al tiempo, originada a dicha concentración fue diferente a las producidas por los tratamientos T2, T3 y T4 de 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 conidias mL^{-1} , mismos que registraron al 4to día una mortalidad del 31,66%, 10,66% y 0% respectivamente y un 60,33%, 46% y 21,33% dos días después. Por su parte el grupo testigo obtuvo una media de mortalidad del 0% mientras duro el bioensayo.

A continuación, se presentan los porcentajes de mortalidad obtenidos, comparando los tratamientos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para discriminación entre medias:

Tabla 8. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 4to día post inoculación

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1	3	60,3333	x
T2	3	31,6667	x
T3	3	10,6667	x
T4	3	0	x
Testigo	3	0	x

Fuente: autora

Tabla 9. Comparación múltiple de los tratamientos por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 6to día post inoculación

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1	3	96,6667	x
T2	3	60,3333	x
T3	3	46,0012	x
T4	3	21,3333	x
Testigo	3	0	x

Fuente: autora

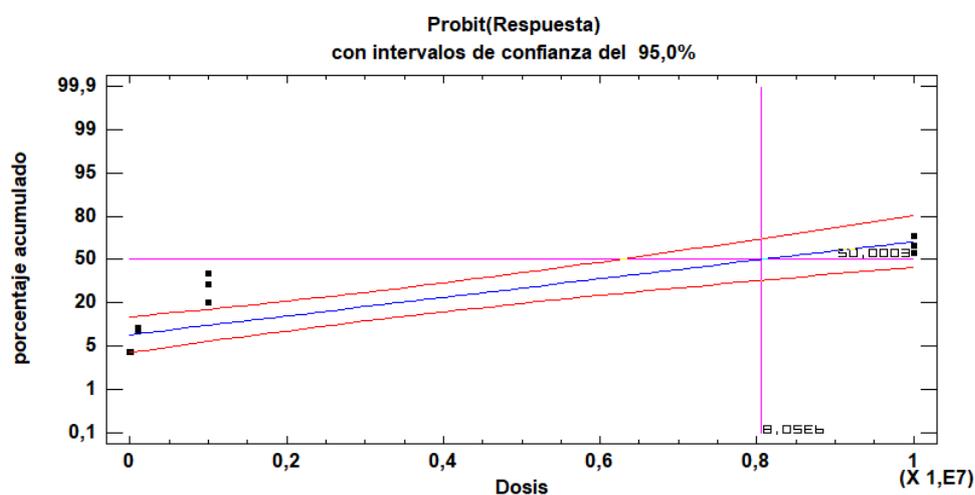
Las tablas 8 y 9 aplican un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras con un nivel del 95,0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma

columna de X's, por lo tanto, al 4to día posterior a la inoculación, el grupo testigo con el tratamiento T4 son grupos homogéneos, mientras que los tratamientos T1, T2, y T3 son grupos independientes, es decir, presentan diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, la tabla 9 registra que al 6to día posterior a la inoculación todos los tratamientos son grupos independientes y con diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados en cuanto a mortalidad se asemejan con los valores obtenidos por otros autores en condiciones similares de laboratorio. El estudio de López (2017), registró al 4to día post inoculación, una mortalidad del 64,8% en brocas adultas, a una concentración del $2,81 \times 10^8$ conidias mL^{-1} , valor cercano al que indica Costa *et al.* (2017), quienes obtuvieron una mortalidad del 66,3% al 4to día post inoculación del hongo en adultos de *H. hampei* a una concentración de $2,95 \times 10^8$ conidias mL^{-1} ; por su parte en el estudio de Chekol & Alemu (2017), se corrobora aún mas la efectividad toxicológica de *B. bassiana*, ya que a una concentración de 1×10^8 conidias mL^{-1} y al 4to día de inoculación, se registró una mortalidad cerca del 60% en especímenes de broca adulta, logrando una mortalidad del 85% tres días después.

Se registraron además tres parámetros específicos (DL_{50} , CL_{50} y TL_{50}) relacionados con la actividad biopesticida de *B. bassiana* mediante el análisis estadístico de Probit para determinación de las variables dosis/tiempo – respuesta dentro un marco de regresión; la dosis registrada para causar mortalidad en el 50% de los individuos (DL_{50}) en la presente investigación, según el modelo de predicciones inversas, corresponde a un valor de $8,05 \times 10^8$ conidias mL^{-1} (ver Gráfica 4), mientras que la dosis registrada para causar mortalidad en el 90% de los individuos indica un valor de $1,51 \times 10^8$ conidias mL^{-1} . Estos datos se asemejan a los registrados en estudios análogos realizados por distintos autores, así Arrubla, Cárdenas & Posada

(2010), indican que una cepa silvestre de *B. bassiana*, obtuvo una DL₅₀ de $9,39 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ y una CL₅₀ de $1,42 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ sobre adultos de *H. hampei*, mientras que Costa *et al.* (2017), encontraron que la DL₅₀ y CL₅₀ necesaria para causar mortalidad en especímenes de broca, fue de un valor de $8,82 \times 10^4$ conidias mL⁻¹ y 1×10^4 conidias mL⁻¹ respectivamente; es necesario recalcar que la CL₅₀ de la presente investigación se halló en un valor de $1,79 \times 10^4$ conidias mL⁻¹, estimación cercana a las registradas en las mencionadas investigaciones.

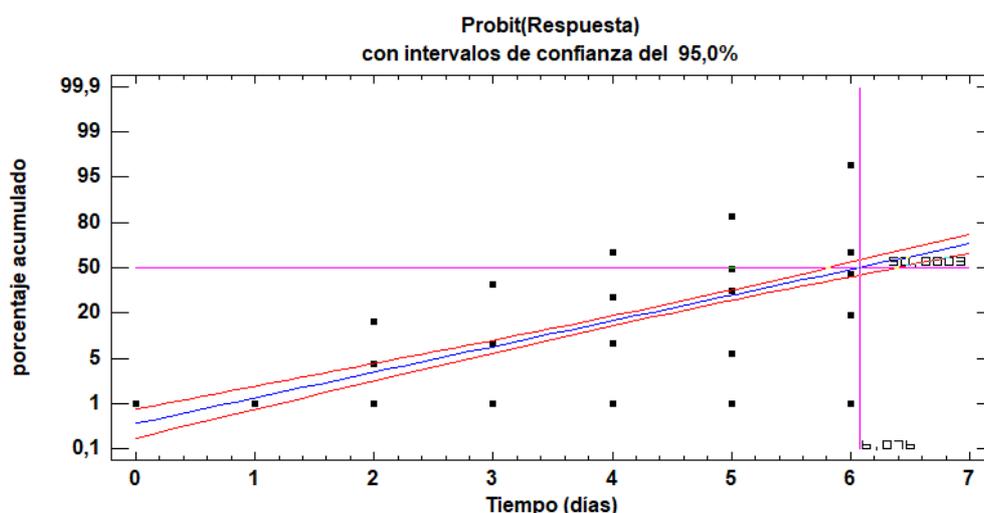


Gráfica 4. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de *H. hampei* según las variables dosis - respuesta.

Fuente: autora: programa STATGRAPHICS Centurion

En cuanto al tiempo necesario para causar mortalidad al 50% de los individuos (TL₅₀), la ecuación para Probit indicó una estimación de 6,07 días para adultos de *H. hampei* (ver Gráfica 5); este valor no difiere de los señalados por distintos autores quienes han indicado que la variabilidad de virulencia entre cepas de *B. bassiana* con relación al tiempo, es debido a distintas particularidades tales como calidad, hábitat proveniente, condiciones de crecimiento, generación, adaptabilidad, concentración, entre otros aspectos. Por su parte, el estudio de Gerónimo *et al.* (2016), en condiciones similares de laboratorio, registró una variabilidad del TL₅₀ entre

aislamientos, al encontrarse con un valor de 2,9 a 4,33 días para causar mortalidad en adultos de *H. hampei*. A su vez, Cova *et al.* (2009), encontraron que el TL₅₀ varió de 4,6 a 3,8 días dependiendo de la concentración, pero este valor para causar mortalidad en especímenes adultos de *Musca domestica*.



Gráfica 5. Regresión Probit para la curva de mortalidad de adultos de *H. hampei* según las variables tiempo - respuesta.

Fuente: autora: programa STATGRAPHICS Centurion

Los resultados de la presente investigación demuestran una vez más la propiedad entomopatógena y biopesticida del hongo *B. bassiana*, destacando la concentración de 1×10^8 conidias mL^{-1} , como la de mayor efectividad toxicológica sobre adultos de *H. hampei*. Esta actividad, puede deberse a que el hongo al secretar la toxina beauvericina presente en su composición a nivel molecular causa mortalidad al entrar en contacto con el cuerpo del insecto destruyendo por completo su sistema; añadido a esto, en su estudio Arboleda *et al.* (2003), mencionan que existe una relación directa entre la cantidad de toxina y la patogenicidad producida por el hongo, causando en el huésped degeneración general.

Aunque el porcentaje de mortalidad de la presente investigación difirió mínimamente de valores registrados por otros autores, se recalca que en condiciones de laboratorio la actividad virulenta de *B. bassiana* cambia. Según González *et al.* (1993), cuando se cultiva el hongo en medios artificiales por más de tres generaciones su virulencia se reduce considerablemente, y el tiempo promedio para causar mortalidad en la mitad de la población se incrementa, mientras que un estudio de Bustillo *et al.* (1996), demuestra que no todos los aislamientos de *B. bassiana* producen la toxina beauvericin en condiciones *in vitro*, sumado a esto la investigación de Jiménez (1992), que menciona que existen diferencias entre razas de *B. bassiana* hacia la broca del café.

En cuanto a los valores de los parámetros DL_{50} , CL_{50} y TL_{50} registrados, se puede constatar que, aunque se encuentren dentro del rango establecido por investigaciones análogas, no siempre estos valores serán similares en condiciones de campo, así Martínez & Ojeda (2017), señalan que en campo la cantidad de conidias que logran llegar al insecto es generalmente reducida, alterando el rango de estos valores en comparación con los obtenidos en laboratorio.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La cepa de *Beauveria bassiana* proveniente del cantón Zaruma demostró adaptabilidad y excelente calidad de crecimiento a nivel *in vitro* bajo condiciones similares a las de su hábitat natural, tales como temperatura a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una HR del 60%; presentó características variables con respecto al tiempo, propias de su especie. A nivel macroscópico destacan las principales: coloración blanca a rosa pálido, textura algodonosa aterciopelada y polvorienta, bordes enteros y forma cruciforme a circular; mientras que a nivel microscópico destacan: hifas hialinas y planas, conidióforos agrupados, raquis en forma de zig-zag y conidios globosos. A su vez el aislamiento presentó una tasa diaria de crecimiento radial TDCR de $3,45 \text{ mm.día}^{-1}$ y un porcentaje de germinación de esporas del 96,6%.

En pruebas de toxicidad por contacto, el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* demostró actividad biopesticida sobre adultos de *Hypothenemus hampei*, a una concentración de 1×10^8 conidias mL^{-1} , alcanzando mortalidades del 60,33% y 96,66% al 4to (96 horas) y 6to día (144 horas) post inoculación del tratamiento, además presentó una alta capacidad para disminuir drásticamente actividades motoras y de desplazamiento, alimentación y barreno con el transcurso de los días.

La DL_{50} obtenida mediante el análisis estadístico de Probit para esta cepa, fue de $8,05 \times 10^8$ conidias mL^{-1} , mientras que la CL_{50} indicó una estimación de $1,51 \times 10^8$ conidias mL^{-1} . A su vez se registró un valor de 6,07 días para el TL_{50} ; valores semejantes a los reportados

para el control de otros insectos, corroborando así la susceptibilidad de *Hypothenemus hampei* a ser controlado por *Beauveria bassiana*.

5.2. Recomendaciones

Los resultados de esta investigación indican que la cepa de *Beauveria bassiana* proveniente del cantón Zaruma, presenta una excelente especificidad de crecimiento y desarrollo sobre medios artificiales, sin embargo es necesaria una identificación a nivel molecular para el establecimiento de claves taxonómicas específicas y caracterización óptima de su especie, probando su adaptabilidad a nivel *in vitro* ante pruebas análogas.

A nivel de campo, *Hypothenemus hampei* se presenta en forma de plaga en los granos de *Coffea* sp. siendo no tan susceptible al ataque de *Beauveria bassiana* como en condiciones de laboratorio, por ello, es necesario efectuar pruebas de toxicidad en campo con distintas concentraciones del hongo, para evaluar la variabilidad de la tasa de mortalidad y su actividad biopesticida.

Esta investigación también indica que *Beauveria bassiana*, además de presentar propiedad biopesticida, actúa como un agente de control biológico, por lo que debe ser incluido en un programa de manejo integrado para *Hypothenemus hampei*, tomando en cuenta que una buena interacción entre especies a nivel de campo favorece a un desarrollo natural del hongo y por ende a un efecto a largo plazo, manteniendo a la población de la plaga bajo el umbral de daño.

REFERENCIAS

- Abebe, M. (1998). Further evidence on the occurrence of coffee berry borer in Ethiopia. *Second Intercontinental Conference on Coffee Berry Borer*, (págs. 75 - 76). Tapachula.
- Allendes, G. (2007). *Evaluación de ocho sepas nativas de Metarhizium anisopliae var. Anisopliae (Metsch.) sorokin., para el control de Aleurothrixus floccosus Maskell*. Quillota: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Altieri, M., Rosset, P., & Nicholls, C. (1997). Biological control and agricultural modernization: Towards resolution of some contradictions. *Agriculture and Human Values* .
- ANECAFÉ. (14 de Noviembre de 2017). *Rendimientos de café grano seco en el Ecuador*. Obtenido de ANECAFÉ : <http://www.anecafe.org.ec/noticias/rendimientos-de-cafe-grano-seco-en-el-ecuador-2017>
- Arboleda, J., Delgado, F., & Valencia, A. (2003). Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 68: 71-76 .
- Arcila, A., Bustillo, A., & Cháves, E. (2006). Estudio de la cepa Bb9205 de *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Revista Cenicafé*, 20.
- Arias, E. (2007). *Aislamiento y patogenicidad del hongo nativo Beauveria bassiana (Bals) Vuill. controlador biológico de la broca del cafeto Hypothenemus hampei (Ferrari)*. San salvador: Universidad de El Salvador .
- Arrubla, P., Cárdenas, M., & Posada, F. (2008). Adherencia de las esporas de *Beauveria bassiana* formuladas en polvo y líquido sobre la broca del café. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 11(1): 123-131.

- Arrubla, P., Cárdenas, M., & Posada, F. (2010). Efecto de la humedad relativa sobre la germinación de las esporas de *Beauveria bassiana* y la patogenicidad a la broca del café *Hypothenemus hampei*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1): 67-76.
- Baker, P. (1986). Biología, ecología y hábitos de la broca . En I. I. Agricultura, *Memori: II Curso regional sobre manejo integrado de plagas del cafeto con énfasis en broca del fruto (Hypothenemus hampeii, Ferr.)* (págs. 120-122). San Pedro Sula.
- Banco Central del Ecuador. (2019). *Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario*. Obtenido de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201804.pdf>
- Barrera, J. F. (2012). *Ficha Técnica Broca del Café Hypothenemus hampei*. México: Senasica.
- Bastida, L., Constante, J., Cuellar, E., Yennifer, M., Perpiñán, J., & Klyslerts, V. (2015). *Hongos Entomopatógenos* . Universidad Popular del Cersar.
- Batista, S., Savoi, L., Biaggioni, R., Tamai, M., & Pereira, R. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 70-77.
- Batistella, S., Paulini, A., & Parra, A. (1983). Informajoes preliminares sobre época de control e flutuagao populacional da broca do café (*Hypothenemus hampei*) é do bicho mineiro para as regiones de sinop e alta floresta no mató grosso. *Ministério da Indústria e do Comércio, Instituto Brasileiro do Café*, 257- 259.
- Bravo, P. A. (2019). *Determinación de la actividad insecticida, repelente y antialimentaria del aceite esencial de molle (Schinus molle) en trips (Frankliniella occidentalis)*. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.

- Brun, L., Stuart, J., Gaudichon, V., Aronstein, K., & Ffrench-Constant, H. (1995). Functional haplodiploidy: A mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. *Proceedings National Academy of Sciences*, 9861-9865.
- Bustillo, A. (2001). *Hongos en Insectos y Posibilidades de Uso en el Control Biológico de Plagas en Colombia*. Colombia. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/275462138_HONGOS_EN_INSECTOSy_POSIBILIDADES_DE_USO_EN_EL_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_EN_COLOMBIA
- Bustillo, A. (2002). *El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia*. Chinchiná: Cenicafé. Obtenido de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/579/1/024.pdf>
- Bustillo, A. (2006). Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Bustillo, A. (2008). La broca del café. Plagas cuarentenarias. *ResearchGate*.
- Bustillo, A., & Posada, J. (1996). El uso de entomopatógenos en el control de la broca del café en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas*, 42: 1-13.
- Bustillo, A., Cárdenas, R., Villaba, D., Benavides, P., Orozco, J., & Posada, F. (1996). *Manejo Integrado de la Broca del Café Hypothenemus hampei en Colombia*. Chinchiná : CENICAFÉ.
- CABI. (27 de Marzo de 2018). *Beauveria bassiana (white muscardine fungus)*. Obtenido de Invasive Species Compendium: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/8785>
- Camilo, J., Olivares, F., & Jiménez, H. (2003). Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. *Agronomía Mesoamericana*, 59-63.

- Campos Almengor, O. (1981). *El gandul Cajanus cajan como hospedero de la broca del fruto del café Hypothenemus hampei (Ferrari 1867) en Guatemala*. Guatemala: 4 Simposio Latinoamericano sobre Caficultura Guatemala.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Cañizalez, L., Guédez, C., Castillo, C., & Olivar, R. (2015). Caracterización de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y su patogenicidad en *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curculionidae, Scolytinae). *Revista ACADEMIA*, 14: 31-42.
- Capek, A., & Fassatiová, O. (1977). Some Biochemical Characteristics of Species of the Genus *Beauveria*. *Folia Microbiologica*.
- Castillo, C., Cañizales, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo- Venezuela. *Revista Academia* .
- Chalfoun, S., Souza, J., & Carvalho, V. (1984). Relação entre a incidência da broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) e microorganismos em grãos de café. *Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*, 149-150.
- Chekol, Y., & Alemu, T. (2017). Bioassay and Pilot Mass Production of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* for the Control of Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*: Scolytidae), Ferrari. . *Journal of Applied Biosciences*, 117: 11669-11683 .
- Choi, Y.-W., Hyde, K. D., & Ho, W. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 29-38.
- Constantino, L., Navarro, L., Berrío, A., Acevedo, F., Rubio, D., & Benavides, P. (2011). Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Revista Colombiana de Entomología*, 173-182.

- Córdova, K. (2012). *Análisis Probit en la determinación de la dosis y el tiempo letal medio en nematodos*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.
- Costa, L., D.Silva, W., Alcarde, R., Garcia, C., S.Bento, J., & De la libera, I. (2017). Autoinoculation trap for management of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) with *Beauveria bassiana* (Bals.) in coffee crops. *Biological Control* , (111): 32-39.
- Cova, L., Scorza-Dagert, J., García, D., Cañizales, L., Guedez, C., Avendaño, M., & Medina, M. (2009). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* en el control de moscas (*Musca domestica*) en condiciones de laboratorio y en galpones avícolas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*.
- Damon, A. (2000). A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research*, 453–465.
- De Haro, J. (15 de Febrero de 2013). Un hongo mortal contra el picudo rojo. *Diario El País*.
Obtenido de https://elpais.com/ccaa/2013/02/15/valencia/1360950552_191881.html
- De Ingunza, M. A. (1966). La "Broca del Café" (*Hypothenemus hampei* Ferr.): Importancia, Distribución Geográfica, Forma de Ataque y Especies de Cafeto que ataca e Influencia de la Altitud sobre el Nivel del Mar en el Grado de Ataque. *Revista Peruana de Entomología* , 82-93.
- De Kraker, J. (1988). The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.): factors affecting emergence and early infestation. Report of field experiments. *Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste*, (pág. 48). Tapachula.
- DeBach, P., & Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. New York: Cambridge University Press .
- Decazy, B. (1990). *Consideraciones sobre el uso apropiado del control químico de la broca del fruto del cafeto Hypothenemus hampei Ferrari*. IICA/Promecafé. Resúmenes: III Taller regional de broca.

- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., Kulmanbetova, A., Zholdoshbekova, S., & Amanbek Kyzy, A. (2019). Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Kyrgyzstan. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Duicela, L., Corral, R., & Fernández, F. (2001). *Producción de café arábigo: guía para el caficultor ecuatoriano*. Obtenido de Google Books: [https://books.google.com.ec/books?id=eoAzAQAAMAAJ&pg=PA36&lpg=PA36&dq=sotomayor,+I.,+%26+Duicela,+L.+\(1995\).+Manual+del+cultivo+del+caf%C3%A9&source=bl&ots=keB4VSmsc5&sig=ACfU3U2ugBJmMckP_tjiFEkiVZ6fVYQgAw&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiPgY7D85vqAhUiPn0KHQGoA](https://books.google.com.ec/books?id=eoAzAQAAMAAJ&pg=PA36&lpg=PA36&dq=sotomayor,+I.,+%26+Duicela,+L.+(1995).+Manual+del+cultivo+del+caf%C3%A9&source=bl&ots=keB4VSmsc5&sig=ACfU3U2ugBJmMckP_tjiFEkiVZ6fVYQgAw&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiPgY7D85vqAhUiPn0KHQGoA)
- Duicela, L., Corral, R., Amores, F., & Guerrero, H. (2004). *Crianza de plántulas de café en el vivero*. Obtenido de FAO: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=EC2005000023>
- El Husseini, M. (2019). Effect of the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, on the beetarmyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) larvae (Lepidoptera: Noctuidae), under laboratory and open field conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*.
- Espinoza, G., & Vallejos, F. (2016). *Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de Beauveria bassiana (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos*. Managua: Universidad Nacional Agraria.
- Fargues, J., Goettel, M., Smiths, N., Ouedraogo, A., & Rougier, M. (1997). Effect of Temperature on Vegetative Growth of *Beauveria bassiana* Isolates from Different Origins. *Mycologia*, 383-392.
- FEDERACAFE. (5 de Agosto de 2010). *EL manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia*. Obtenido de Café-Noticias: <http://cafe-noticias.over-blog.com/article-el-manejo-de-cafetales-y-su-relacion-con-el-control-de-la-broca-del-cafe-en-colombia-54972510.html>

- Franqui, R. A., & Medina Gaud, S. (2003). *La Broca del Café, Hypothenemus hampei (Ferrari): Biología y Aspectos Básicos de Control*. Obtenido de Doc Player: <https://docplayer.es/71307620-La-broca-del-cafe-hypothenemus-hampe-ferrari-coleoptera-scolytidae-se-encuentra-entre-las-plagas-de-mayor-importancia-en-este-cultivo.html>
- Friederichs, K. (1922). Measures against the coffee berry borer on the Karang Redjo Estate. . *Meded*, 1-22.
- García, M., Cappello, S., Leshner, J., & Molina, R. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa de control biológico. *Revista de Divulgación*.
- García, T., Aznar, E., Perez, P., & Lorente, P. (2011). Aislamiento de *Beauveria bassiana* en una muestra de lavado broncoalveolar procedente de un paciente con cáncer de vejiga. *Revista Iberoamericanade Micología*, 28(4):198-199.
- Gerónimo, J., Torres, M., Pérez, M., De la Cruz, A., Ortiz, C., & Cappello, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Glare, T., & Inwood, A. (1998). Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research*, 102 (2):250-256.
- Gonzales, A. L., & Miranda, A. P. (2017). *Determinación de la concentración letal 50 de dos cepas de hongos entomopatógenos aisladas y dos cepas comerciales de Beauveria sp y Metarhizium sp, en larvas de Tecia solanivora*. Bogotá: Universidad Santo Tomas.
- González, M., Posada, F., & Bustillo, A. (1993). Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Revista Cenicafé*, 93-102.

- Heredia Rivera, S. (2015). *El registro de plaguicidas en el Ecuador, un estudio desde la perspectiva de la agroecología*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Hernández, R. (2005). *La Broca del Fruto del Café*. Obtenido de InfoAgro: http://www.infoagro.go.cr/InfoRegiones/Publicaciones/broca_cafe.pdf
- Hoog, G. S. (1972). *The genera Beauveria, Isaria, Tritirachium and Acrodontium gen. nov.* Baarn: Studies in Mycology.
- Humber, R. (2005). *Entomopathogenic Fungal Identification*. New York. Obtenido de <https://www.ars.usda.gov/ARSDocuments/2005/80620520/apswkshoprev.pdf>
- ICA. (2020). *Identificación de coleópteros de granos almacenados utilizando caracteres morfológicos*. Obtenido de Instituto Colombiano Agropecuario: <https://portal.ica.gov.co:447/DocManagerSwift/User/HTMLServe.ashx?E=6F72D5A7A8D8BFED449BC67D061B7E2A&PE=09C57DA5BE145FF5637DEA2CFC93475C&S=40&P=False&R=1895193719>
- INEC. (Enero de 2020). *Información Agroambiental y Tecnificación Agropecuaria Módulo ESPAC 2018*. Obtenido de INEC: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Modulo_Ambiental_ESPAC_2018/RESULT_MOD_AMB_ESPAC_2018.pdf
- INEN. (1996). *Norma Técnica Ecuatoriana 1898. Plaguicidas: Clasificación Toxicológica*. Obtenido de Agrocalidad: <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dria/INEN-1898-plaguicidas-clasificacion-toxicologica.pdf>
- International Coffee Organization . (2020). *International Coffee Organization* . Obtenido de Domestic consumption by all exporting countries: <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1b-domestic-consumption.pdf>

- Jaramillo, J., Borgemeister, C., & Baker, P. (2006). Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bull. Entomol. Res.*, 96: 1-12.
- Jaramillo, J., Montoya, E., Benavides, P., & Góngora, C. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Jiménez, J. A. (1992). Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. *Revista Cenicafé*, 43(3): 84-98 .
- Johannesson, N., & Mansingh, A. (1984). Host-pest relationship of the genus *Hypothenemus* (Coleoptera: Scolytidae) with special reference to the coffee berry borer, *H. hampei*. *Journal of Coffee Research*, 43-56.
- Klein, C. (s.f.). *La Broca del Café*. Obtenido de http://www.infoagro.net/sites/default/files/migrated_documents/attachment/3Broca_del_Cafe.pdf
- Lagos, A. (2009). *Normalización de la dieta artificial y evaluación de actividad insecticida contra la broca del café (Hypothenemus hampei Ferrari) de extractos vegetales de plantas recolectadas en la ecorregión cafetera*. Pereira: CIEBREG.
- Lazo, R. (1990). *Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto Hypothenemus hampei al hongo entomopatógeno Beauveria bassiana y su tolerancia al oxiclورو de cobre*. Turrialba : CATIE. .
- Le Pelley, R. H. (1968). *Las plagas de cafeto*. Barcelona: Editorial Labor S.A. .
- Leefmans, S. (1923). The coffee berry borer, *S. hampei*. I. Life history and ecology. *Meded. Inst. Plantenzieken*, 61-67.

- Lezaun, J. (2016). *Broca del café, el enemigo principal de los cafetales*. Obtenido de CropLife: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/broca-del-café>
- López, C. (2017). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* en generaciones reproductivas. *Apthapi: Revista de la Carrera de Ingeniería Agronómica - UMSA*, 639-651.
- López, G., Valdez, J., Cruz, L., Barrera, J., Malo, E., & Rojas, J. (2011). Morphology and structural changes in flight muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) females. *Environmental Entomology*, 40: 441-448.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 10-18.
- MAGAP. (2016). *Listado de plaguicidas prohibidos y restringidos en el Ecuador*. Obtenido de Agrocalidad: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/08/plaguicidas-prohibidos-y-restringidos-en-el-ecuador1.pdf>
- Malpartida, J., Narrea, M., & Dale, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2): 75-81.
- Mansingh, A. (1991). Limitations of insecticides in the management of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *J Coffee Res.*, 21: 67-98.
- Martínez, M., & Ojeda, R. (2017). Caracterización patogénica del hifomiceto entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista CUMBRES*, 3:69-75.
- Mendoza, J. (2014). *Plagas del café: guía para su reconocimiento y control*. Quito: INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Mestre, M., & Salazar, A. (2015). La investigación agronómica del café en Colombia. *Cenicafé*, 65-69.

- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 95 - 103 .
- Morallo-Rejesus, B., & Baldos, E. (1980). The biology of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Scolytidae: Coleoptera) and its incidence in the southern Tagalog provinces. *Philippine Entomologist*, 303-316.
- Morocco, V. (2018). *Efecto de hongos nativos entomopatógenos sobre la hembra adulta de Orthezia olivicola beingolea 1965 (Hemiptera: ortheziidae) queresa móvil del olivo*. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Naranjo, A. (2017). *La otra guerra: la situación de los plaguicidas en Ecuador*. Quito.
- Nava, E., García, C., Camacho, J., & Vázquez, E. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*.
- Nereida, P. (2016). *Evaluación de la eficacia de un insecticida biológico mediante análisis Probit*. Obtenido de Universidad Central de Venezuela: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Clase_practica_control_microbiologico_FMIIP_2016.pdf
- Nicholls, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- Noboa, G., & Quelal, A. (2015). *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productores de café orgánico de la Asociación "Río Intag", cantón Cotacachi*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Palacios, D. (2009). *"Efectividad De La Reproducción En Medio De Cultivo Líquido De La Cepa Nativa Beauveria Bassiana, Como Controlador Biológico De La Broca Del Fruto De Cafeto, Hypothenemus Hampei"*. San Salvador: Universidad de El Salvador .

- Párraga, Á. (2017). *Efecto de trampas artesanales para el monitoreo y control de broca del café (Hypothenemus hampei Ferr.) en el cantón Bolívar, Manabí*. Calceta: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.
- Pedrique, M., & Gutierrez, S. (2001). *Obtención de cultivos puros*. Obtenido de Universidad Central de Venezuela: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Obtenci%C3%B3n_de_cultivos_puros.pdf
- Pinto, W. (10 de Mayo de 2015). Agricultores, en riesgo por el uso de los agroquímicos. *Diario El Universo*.
- Posada-Flores, F., & Pava, M. (14 de Febrero de 2009). *La broca y el café en Puerto Rico*. Obtenido de Academia Edu: https://www.academia.edu/28072671/La_broca_y_el_caf%C3%A9?auto=download
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de Acción de los Hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 856-860.
- Rivero, M., Acosta, N., & Kornuta, C. (Abril de 2016). *Bioestadística Aplicada: Software DL50*. Obtenido de Universidad Nacional la Plata: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/53066/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Román Ruiz, A. (2017). *Factores que influyen en la dispersión espacio-temporal de broca del café Hypothenemus hampei (Coleoptera: Curculionidae)*. Chiapas.
- Rudinsky, J. (2017). Ecology of Scolytidae. *Review of Entomology*, 327- 348.
- Salazar, M., Pulgarín, J., Riaño, N., & Bustillo, Á. (1993). Crecimiento y desarrollo del fruto del café y su relación con la broca. *Avances Técnicos Cenicafé*.

- Sampedro, L., Villanueva, J., & Rosas, J. (2008). Aislamiento y validación en campo de *Beauveria bassiana* (balsamo) contra *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en la región cafetalera del municipio de Atoyac de Álvarez, Gro. México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*.
- SIPA. (2017). *Boletín Situacional Café*. Obtenido de Ministerio de Agricultura y Ganadería: http://sipa.agricultura.gob.ec/boletines/situacionales/boletin_situacional_cafe_2017.pdf
- SIPA. (2018). *Ficha del cultivo del café (Coffea sp.)*. Obtenido de Ministerio de Agricultura y Ganadería: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/café>
- SIPA. (2019). *Informe de Rendimientos Objetivos Café Grano Oro*. Obtenido de Ministerio de Agricultura y Ganadería: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cafe/rendimiento-del-cafe-ecuador>
- Sotomayor, I., & Duicela, L. (1993). *Manual del cultivo del café*. Quevedo: gtz.
- Sotomayor, I., & Duicela, L. (1995). *Inventario Tecnológico del Cultivo de Café*. Quevedo: INIAP.
- Sponagel, K. (1994). *La broca del café Hypothenemus hampei en plantaciones de café robusta en la Amazonía Ecuatoriana*. Giessen: Wissenschaftlicher, Fachverlag.
- Téllez-Jurado, A., Cruz, M., Flores, Y., Asaff, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología* , 73-80.
- Urbina, N. (1987). La broca del fruto del cafeto, *Hypothenemus hampei*, y su control. . *CATIE*, 48-59.
- Vázquez, L., Alfonso, J., Ramos, Y., Martínez, A., Moreno, D., & Matienzo, Y. (2012). Relaciones de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) con el suelo del cafetal como base para su manejo agroecológico. *Agroecología* , 7: 81-90.

- Vega, F., Benavides, P., Stuart, J., & O'Neill, S. (2002). *Wolbachia* Infection in the Coffee Berry Borer. *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 374-378.
- Vela, P., Pineda, J., Duarte, A., Soto, C., & Pineda, C. (2018). Cepa nativa ecuatoriana de *Beauveria bassiana* con potencial industrial . *Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente CEBA*.
- WHO. (2010). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009*. Obtenido de World Health Organization: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44271/9789241547963_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Wraight, S., & Ramos, M. (2017). Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3): 348-363.
- Yanez, L. (2016). *Aislamiento de dos cepas nativas del hongo (Beauveria bassiana) para el control de la broca del café (Hypothenemus hampei) con tres tipos de concentraciones de unidades formadoras de colonias en el laboratorio de microbiología de la Universidad Estatal B. Guaranda* .
- Zambrano, J., Chong, J., Mite, F., Venegas, F., Mendoza, J., & Klein, C. (1995). *Curso sobre cultivo del café*. Pichilingue: INIAP.
- Zeas, K. (2015). *Investigar el café Zarumeño de provincia de El Oro*. Quito: UTE Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1. Hospederos de *Hypothenemus hampei*

Se presentan algunos de los hospederos alternos en donde la broca del café es capaz de sobrevivir y alimentarse.

Tabla 10. Hospederos alternos de *Hypothenemus hampei*

Familia	Nombre	Hospedera Primaria	Hospedera Alterna
Capparidaceae	<i>Cleome rutidosperma</i> DC.		19 días de alimentación
Convolvulaceae	<i>Operculina turpethum</i> (L.)		11 días de alimentación
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea</i> sp.	Sí	
Euphorbiaceae	<i>Ricinus</i> sp.		Sí
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i> L.		13 días de alimentación
Fabaceae	<i>Acacia decurrens</i> Willd.		
Fabaceae	<i>Acacia ingrata</i> Benth.		9 días de alimentación
Fabaceae	<i>Arachis hypogaea</i> L.		
Fabaceae	<i>Caesalpinia</i> sp.		Sí
Fabaceae	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw.		13 días de alimentación
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Sí	
Fabaceae	<i>Calapogonium mucunoides</i> Desv.		14 días de alimentación
Fabaceae	<i>Cassia occidentalis</i> L.		15 días de alimentación
Fabaceae	<i>Centrosema plumieri</i> (Pers.) Benth		Sí
Fabaceae	<i>Centrosema pubescens</i> Benth.		12 días de alimentación
Fabaceae	<i>Crotalaria juncea</i> L.		13 días de alimentación
Fabaceae	<i>Dialium</i> sp.	Sí	
	<i>Dialium lacourtianum</i> De Wild ex. Vermeesen	Sí	
Fabaceae	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.)	Sí	Sí
Fabaceae	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.)	Sí	Sí

Fabaceae	<i>Leucaena glauca</i> De Wit.		Sí
Fabaceae	<i>Mimosa pudica</i> L.		4 días de alimentación
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i> L.		
Fabaceae	<i>Phaseolus lunatus</i> L.		Sí
Fabaceae	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Roxb.) Benth		10 días de alimentación
Fabaceae	<i>Tephrosia candida</i> DC.		Sí
Malvaceae	<i>Hibiscus</i> sp.		En semillas
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> L.		
Oleaceae	<i>Ligustrum pubinerve</i>		Perforación en los frutos
Passifloraceae	<i>Passiflora foetida</i> L.		13 días de alimentación
Poaceae	<i>Zea mays</i> L.	Sí	
Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.)		Sí
Rosaceae	<i>Rubus rosaeiflorus</i> Hook.		11 días de alimentación
Rosaceae	<i>Rubus</i> sp.		En semillas
Rubiaceae	<i>Coffea canephora</i>	Sí	
Rubiaceae	<i>C. arabica</i> L.	Sí	
Rubiaceae	<i>C. dewevrei</i>	Sí	
Rubiaceae	<i>C. dybowski</i>	Sí	
Rubiaceae	<i>C. excelsa</i>	Sí	
Rubiaceae	<i>C. liberica</i>	Sí	
Rubiaceae	<i>Ixora</i> sp.		10 días de alimentación
Rubiaceae	<i>Psychotria luconiensis</i> (Cham. & Schitdl.)	Sí	Sí
Rubiaceae	<i>Oxyanthus</i> sp.	Sí	Sí
Rubiaceae	<i>Pavetta schumanniana</i> F.Hoffm. ex K.Schum.)		Perforaciones en los frutos
Solanaceae	<i>Solanum biflorum</i> Lour.		12 días de alimentación
Solanaceae	<i>Solanum ferox</i> L.		6 días de alimentación
Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i> L.		8 días de alimentación
Solanaceae	<i>Solanum seaforthianum</i>		7 días de alimentación
Sterculiaceae	<i>Cola</i> sp.		

Vitaceae

Vitis lanceolaria
(Roxb.) Wall.

Perforaciones en los frutos

Fuente: Campos (1981); Decazy (1990); Friederichs (1922); Le Pelley (1968); Morallo-Rejesus & Baldos (1980); Urbina (1987)

Anexo 2. Obtención del material biológico para la fase experimental

Recolección y desinfección del material biológico proveniente del cantón Zaruma, para la realización del trabajo experimental.



Figura 9. Presencia de *Beauveria bassiana* e *Hypothenemus hampei* en granos de café

Fuente: autora



Figura 10. Desinfección de granos recolectados

Fuente: autora

Cría de los especímenes de *H. hampei* a nivel de laboratorio y recuperación de los mismos para su posterior caracterización y evaluación.



Figura 11. Cámara climática para la cría de los especímenes de broca

Fuente: autora



Figura 12. Obtención de los especímenes del insecto a partir de granos de café atacados a nivel de laboratorio

Fuente: autora

Anexo 3. Caracterización biológica de *Hypothenemus hampei*

Confirmación de la especie en comparación con claves taxonómicas propuestas por distintos autores.

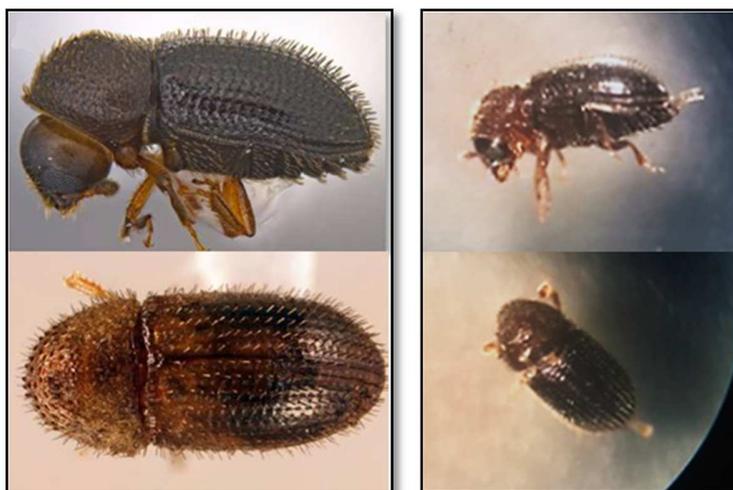


Figura 13. Vista lateral y dorsal del cuerpo del insecto

Fuente: Izquierda: ICA (2020); derecha: autora



Figura 14. Características de la antena de *H. hampei*.

Fuente: Izquierda: ICA (2020); derecha: autora



Figura 15. Diferencia de tamaño entre una hembra y macho adultos.

Fuente: Izquierda: Constantino *et al.* (2011); derecha: autora



Figura 16. Presencia de dos pares de alas (élitros y alas membranosas) en una hembra adulta.

Fuente: autora

Anexo 4. Aislamiento, purificación y caracterización de *Beauveria bassiana*

Metodología de aislamiento, purificación y caracterización de la cepa obtenida, para confirmación de especie.

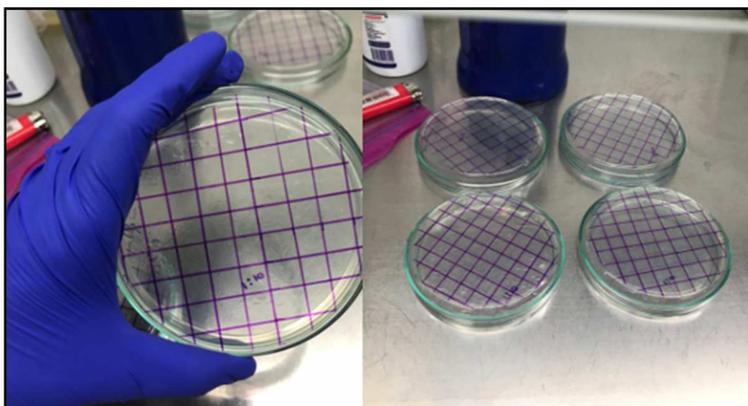


Figura 17. Procedimiento de purificación del hongo mediante el método de aislamiento monospórico.

Fuente: autora

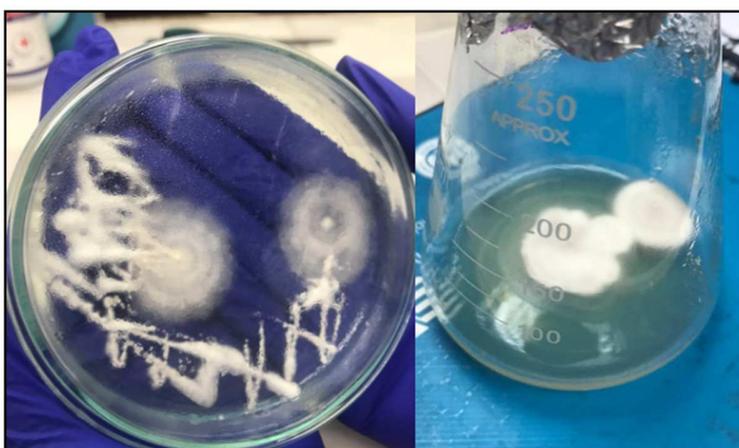


Figura 18. Aislamiento primario y reaislamiento utilizado para cultivo monospórico

Fuente: autora



Figura 19. Colonia utilizada para caracterización macro y microscópica.

Fuente: autora

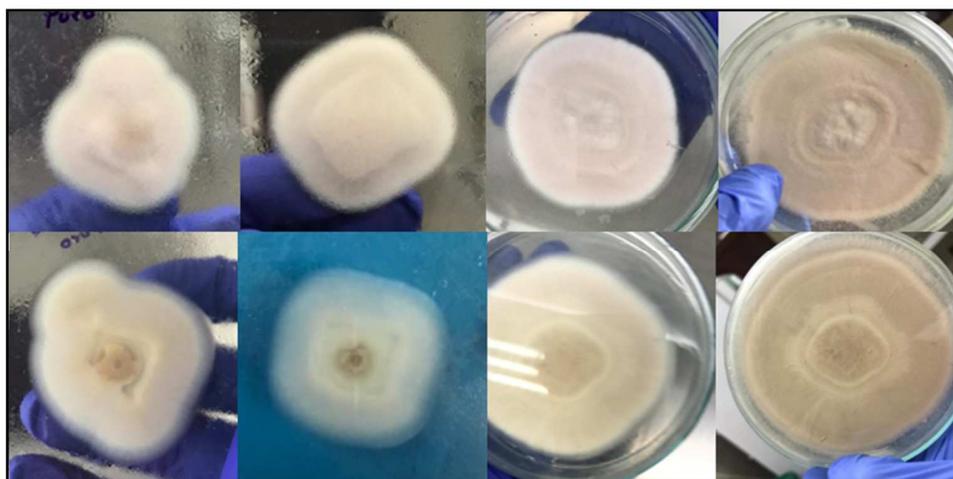


Figura 20. Características macroscópicas: anverso y reverso de la colonia de los diferentes aislamientos

Fuente: autora

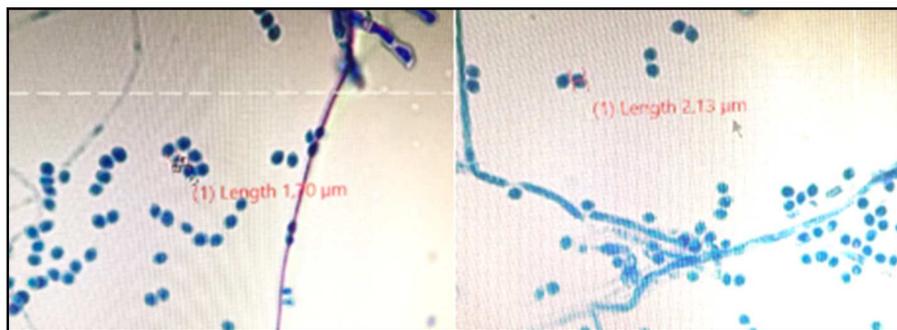


Figura 21. Características microscópicas: forma y tamaño de las conidias del hongo.

Fuente: autora

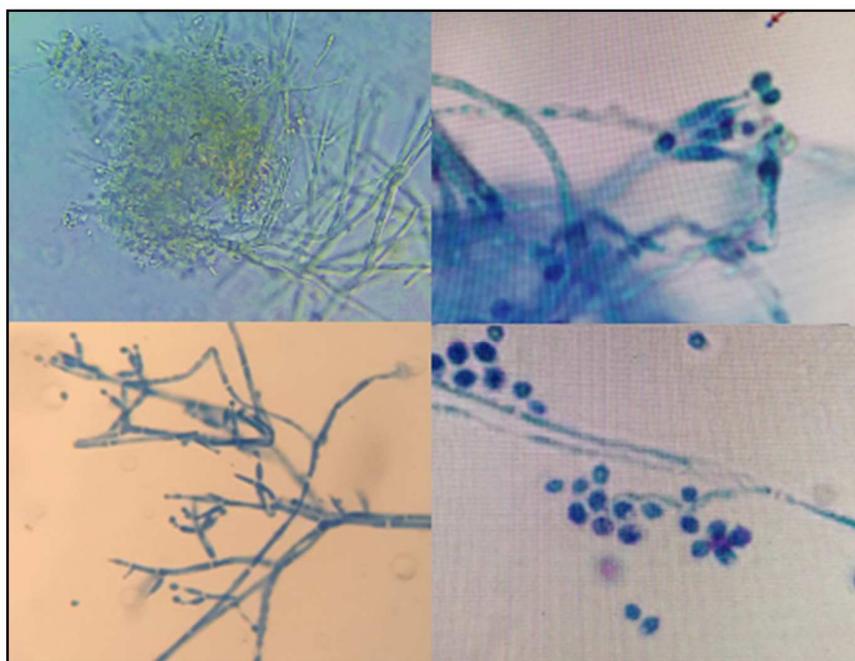


Figura 22. Características microscópicas: forma de las diferentes estructuras micromorfológicas del aislamiento, tales como: aparato conidial, células conidiógenas, raquis en forma de zig-zag y conidias.

Fuente: autora

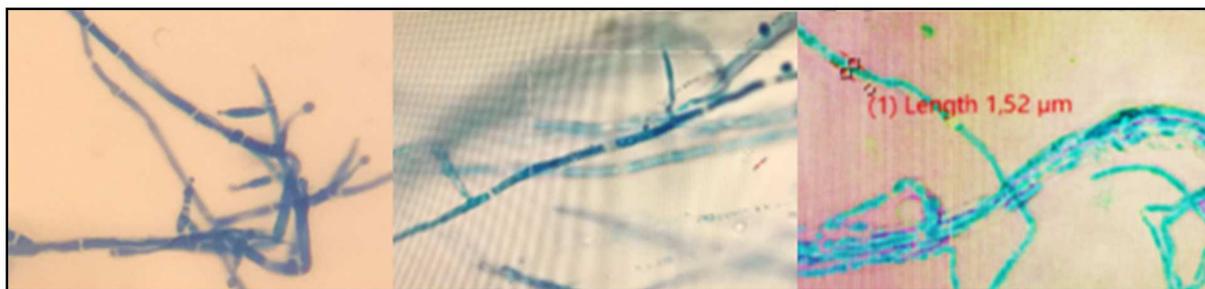


Figura 23. Características microscópicas: forma y tamaño del aparato hifal.

Fuente: autora

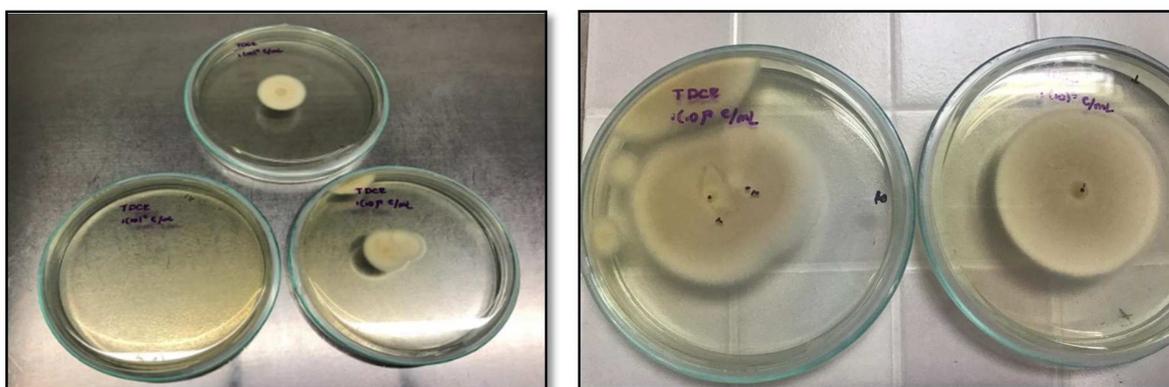


Figura 24. Cepas utilizadas para la evaluación de la velocidad de crecimiento

Fuente: autora



Figura 25. Vista microscópica de las esporas del hongo para evaluación de su germinación

Fuente: autora

Anexo 5. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*

Ensayo de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei* en condiciones similares a las de su hábitat natural a nivel de laboratorio.



Figura 26. Ensayo de patogenicidad de los distintos tratamientos sobre los especímenes de broca a nivel de laboratorio

Fuente: autora

Efectos causados por *B. bassiana* al entrar en contacto con adultos de *H. hampei*.



Figura 27. Izquierda: a simple vista, reducción de actividades motoras y de alimentación en adultos de broca al entrar en contacto con las distintas concentraciones del hongo; derecha: vista al estereoscopio de los mismos especímenes de la imagen izquierda, con inicio de crecimiento fungoso en su morfología.

Fuente: autora



Figura 28. Vista al estereoscopio: izquierda: inicio del crecimiento fungoso sobre el cuerpo (ano) de un adulto broca; derecha: cadáver irreconocible de un adulto broca completamente cubierto por el micelio del hongo.

Fuente: autora