

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

**Evaluación de aislados de *Beauveria* spp. como biocontrolador de broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) en las principales zonas cafetaleras del cantón Morona**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo


**Autor:**

Santiago Enrique Proaño Mendoza

Marlon Rubén Rubio Delgado

**Director:**

Walter Iván Larriva Coronel

ORCID:  0000-0002-9292-1119

Cuenca, Ecuador

2023-03-21

## Resumen

El cultivo del café arábigo es importante en la provincia de Morona Santiago, debido al Proyecto de Reactivación del Café y Cacao Fino de Aroma impulsado por el MAG. Sin embargo, la caficultura en esta zona busca mejorar sus ingresos produciendo café orgánico. Las pérdidas ocasionadas por *Hypothenemus hampei* son altas, de ahí que el uso de organismos entomopatógenos como una alternativa del manejo integrado de plagas puede resultar satisfactoria. *Beauveria* spp. es un entomopatógeno eficaz para el control de plagas, por tanto, el presente trabajo de investigación evaluó aislados de *Beauveria* spp. como biocontrolador sobre *H. hampei*. Se recolectaron brocas infectadas con *Beauveria* spp. en 13 fincas correspondientes a las parroquias Cuchaentza, General Proaño, San Isidro, Sinaí y Sevilla Don Bosco - Cantón Morona, las cepas de *Beauveria* spp. se aislaron mediante siembra directa del micelio en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. Dentro de la identificación morfológica a nivel macroscópico se evaluó: forma, elevación, textura del micelio, color anverso y reverso, superficie y presencia de sinnemas. A nivel microscópico se evaluó: longitud de conidióforos, fiálides y el tamaño de conidias. La capacidad biocontroladora se determinó mediante un bioensayo a nivel de laboratorio, en el cual se inocularon adultos de *H. hampei* con una solución de *Beauveria* spp. a una concentración  $1 \times 10^7$  conidias/ml. Se determinó el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal al 50%. Las cepas 1, 6, 41 y 53 presentaron mayores porcentajes de mortalidad a lo largo del experimento con respecto al control.

*Palabras clave:* entomopatógeno, *Hypothenemus hampei*, *Beauveria*, *Coffea arabica*

### Abstrac

The cultivation of coffee has taken on great importance in the province of Morona Santiago, partially due to the project "Reactivación del Café y Cacao Fino de Aroma," promoted by the MAG. However, coffee growers in this area seek to improve their income by producing specialty coffee - one of these being organic coffee. Crop losses caused by the *Hypothenemus hampei* insect are high. To combat this, the use of entomopathogenic organisms as an alternative to integrated pest management can be satisfactory. *Beauveria* spp. encompasses one of the most effective genera of entomopathogenic fungi for pest control; therefore, the present research work evaluates *Beauveria* spp. as a biocontroller for *H. hampei*. Borers infected with *Beauveria* spp. in 13 farms, corresponding to the Morona Canton parishes Cuchaentza, General Proaño, San Isidro, Sinaí and Sevilla Don Bosco, were isolated by direct sowing of the mycelium in petri dishes with a potato dextrose agar culture medium. For morphological identification at the macroscopic level, the following elements were evaluated: shape, elevation, texture of the mycelium and the front and back color, surface, and the presence of sinnemas. As for the microscopic level, the following were evaluated: length of conidiophores, phialides, and size of conidia. The biocontrol ability was determined by means of a bioassay at the laboratory level, in which adults of *H. hampei* were inoculated with a solution of *Beauveria* spp. at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/ml. Percentage of mortality was determined over a period of 15 days and the lethal time set at 50%. Strains 1, 6, 41 and 53 experienced higher percentages of mortality throughout the experiment with respect to the control.

*Keywords:* entomopathogenic, *Hypothenemus hampei*, *Beauveria*, *Coffea arabica*

## Índice de contenido

Resumen .....	2
Abstrac .....	3
Lista de tablas .....	6
Lista de imágenes .....	7
Lista de figuras .....	8
Lista de anexos .....	9
Introducción .....	14
Objetivos .....	16
2.1    Objetivo General .....	16
2.2    Objetivos Específicos .....	16
Revisión bibliográfica .....	17
3.1    El cultivo de café .....	17
3.2    Principales plagas y enfermedades del cultivo de café .....	17
3.2.1. La broca del café ( <i>Hypothenemus hampei</i> ) .....	18
3.2.2. Clasificación taxonómica de la broca del café .....	18
3.2.3. Daños e importancia económica.....	18
3.3. Manejo de plagas del cultivo de café .....	19
3.3.1 Control alternativo de <i>H. hampei</i> .....	19
3.4 El hongo <i>Beauveria</i> spp. ....	20
3.4.1 Clasificación taxonómica de <i>Beauveria</i> spp.....	20
3.4.2 Hospederos .....	21
3.5 Clasificación morfológica.....	21
3.5.1 Características Macroscópicas .....	21
3.5.2 Características Microscópicas .....	22
Materiales y métodos.....	27
4.1 Área de estudio .....	27
4.2 Materiales .....	27
4.2.1 Material Físico .....	27
4.2.2 Material Biológico .....	28
4.2.3 Material Químico.....	28
4.2.4 Material Informático .....	28
4.3 Metodología .....	28
4.3.1 Metodología del primer objetivo específico (Identificar morfológicamente cepas de <i>Beauveria</i> spp. en condiciones de laboratorio) .....	28
4.3.2 Metodología del segundo objetivo específico (Evaluar la patogenicidad de las cepas de <i>Beauveria</i> spp. sobre la broca del café en condiciones de laboratorio).....	30

Resultados.....	33
5.1. Porcentaje de Infestación y numero de cepas aisladas por finca .....	33
5.2. Análisis de frecuencias de las características de la zona .....	34
5.3. Análisis de las características macroscópicas.....	35
5.4. Análisis de las características microscópicas.....	39
5.5. Análisis de Conglomerados.....	39
5.6. Evaluación de la capacidad biopesticida .....	41
5.6.1 Porcentaje de Mortalidad.....	41
5.6.2 Tiempo Letal Medio (TL50).....	44
Discusión .....	45
Conclusiones .....	47
Recomendaciones .....	47
Referencias .....	48
Anexos .....	55

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la broca del café. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Beauveria</i> spp. ....	20
<b>Tabla 3.</b> Niveles de infestación de <i>H. hampei</i> y presencia del <i>Beauveria</i> spp. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 5 días post-inoculación. ....	41
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 10 días post-inoculación. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 15 días. ....	42

## Lista de imágenes

<b>Imagen 1.</b> Formas y características del hongo <i>Beauveria</i> spp. ....	22
<b>Imagen 2.</b> Estructuras microscopias de <i>Beauveria</i> spp. ....	22
<b>Imagen 3.</b> Broca del Café infectada con <i>Beauveria</i> spp. ....	23
<b>Imagen 4.</b> Mapa de Zonas muestreadas dentro del cantón Morona. ....	27

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Frecuencia de las parroquias en las que se encontró el hongo <i>Beauveria</i> spp....	34
<b>Figura 2.</b> Frecuencia de la vegetación de las fincas en las que se encontró el hongo <i>Beauveria</i> spp.....	34
<b>Figura 3.</b> Frecuencia de las variedades de café en las que se encontró el hongo <i>Beauveria</i> spp.....	35
<b>Figura 4.</b> Frecuencia de las formas en del hongo <i>Beauveria</i> spp. ....	35
<b>Figura 5.</b> Frecuencia de las distintas elevaciones del hongo <i>Beauveria</i> spp.....	36
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de las texturas del micelio del hongo <i>Beauveria</i> spp.....	36
<b>Figura 7.</b> Frecuencia del color adverso de la caja petri que contiene al hongo <i>Beauveria</i> spp. ....	37
<b>Figura 8.</b> Frecuencia del color reverso de la caja petri que contiene al hongo <i>Beauveria</i> spp. ....	37
<b>Figura 9.</b> Frecuencia de la superficie del hongo <i>Beauveria</i> spp.....	38
<b>Figura 10.</b> Frecuencia de la presencia de sinnemas del hongo <i>Beauveria</i> spp.....	38
<b>Figura 11.</b> Dendograma de las cepas de <i>Beauveria</i> spp.....	40
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de mortalidad de las cepas analizadas en el bioensayo. ....	43
<b>Figura 13.</b> Tiempo letal medio para las cepas analizadas en el bioensayo.....	44



## Lista de anexos

<b>Anexo A.</b> Evaluación de la infestación de broca dentro de las fincas .....	55
<b>Anexo B.</b> Recolección de cerezas brocadas con presencia de <i>Beauveria</i> spp. ....	55
<b>Anexo C.</b> Preparación de medio PDA.....	56
<b>Anexo D.</b> Siembra del insecto infectado con el hongo en medio PDA .....	56
<b>Anexo E.</b> Siembra del hongo para realizar cultivo monospórico .....	57
<b>Anexo F.</b> Evaluación de la germinación de esporas para cultivo monospórico .....	57
<b>Anexo G.</b> Caracterización macroscópica con guía en la “Imagen 1” .....	58
<b>Anexo H.</b> Caracterización microscópica de las conidias con guía en la “Imagen 2” .....	58
<b>Anexo I.</b> Caracterización microscópica de las fiálides con guía en la “Imagen 2” .....	59
<b>Anexo J.</b> Caracterización microscópica de los conidióforos con guía en la “Imagen 2” .....	60
<b>Anexo K.</b> Cría del insecto <i>Hypothenemus hampei</i> .....	60
<b>Anexo L.</b> Determinación de la concentración de conidias.....	61
<b>Anexo M.</b> Evaluación de la capacidad biopesticida.....	62
<b>Anexo N.</b> Adultos de <i>H. hampei</i> infectados con <i>Beauveria</i> spp. ....	62
<b>Anexo O.</b> Tamaños de las distintas estructuras microscópicas del hongo .....	63
<b>Anexo P.</b> Características macroscópicas del hongo .....	66

## Agradecimiento

A Dios, por brindarme la sabiduría necesaria para desarrollar este trabajo de titulación y por guiarme durante todo este camino.

A mis padres Luis Proaño y Gerardina Mendoza, por su constante apoyo y quienes fueron una luz durante mi vida estudiantil.

A mis tíos Miguel Ángel Salinas y Julia Mendoza que al igual que mis padres me han apoyado y me han brindado sus sabios consejos.

A todo el cuerpo docente de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Cuenca, especialmente a nuestro director de tesis, el Ing. Walter Larriva, quien no solo me inspiró a desarrollar este trabajo de titulación, si no también nos guió durante el desarrollo del mismo.

A la Estación Experimental Central de la Amazonía – INIAP, especialmente a los Ing. Javier Chuquimarca, Ing. Jimmy Pico e Ing. Cristian Subía quienes nos colaboraron en el desarrollo del presente trabajo de titulación.

A mi compañero de tesis Marlon Rubio, y a mis amigos Miguel Vélez y Ronny García, quienes durante este viaje llamado universidad, supieron apoyarme y sacarme una sonrisa.

A mi novia Lizbeth Sacoto por el soporte emocional que me ha brindado a lo largo del desarrollo de este trabajo de titulación.

Santiago Proaño

### Agradecimiento

Gracias a Dios por bendecirme a lo largo de mi vida, mantenerme con salud y fortaleza para conseguir mis metas académicas, de igual manera por guiar mis pasos y poner en mi camino a excelentes personas.

Gracias a mi familia, mi papá Rubén Rubio por enseñarme que nada es imposible en el transcurso del tiempo, a mi mamá Gloria Delgado que me enseñó a nunca bajar la cabeza y respetar a todos por igual, a mis hermanas Nicole y Doménica que siempre me apoyaron en mis días difíciles y a todos mis familiares que confiaron en mí para seguir adelante.

Gracias a mis amigos que a lo largo del tiempo se volvieron parte de mi familia, a mi compañero de tesis Santiago Proaño en especial que nunca dejó que me rinda bajo ninguna circunstancia, también Miguel Vélez y Ronny García con quienes hemos convivido los mejores momentos de mi vida, les agradezco por contar con su amistad tan grata y duradera.

Gracias a la institución INIAP, sus Ingenieros y técnicos que nos ayudaron con el proyecto, al igual quiero agradecer a nuestro tutor de tesis el Ingeniero Walter Larriva que nos brindó todo su apoyo para culminar exitosamente nuestra carrera.

Marlon Rubio

## Dedicatoria

A mi padre Luis Proaño, quien ha sabido afrontar sus dolencias con coraje y valentía, siendo un ejemplo de lucha y fortaleza a lo largo de mi vida.

A mi madre Gerardina Mendoza, quien ha inculcado en mi ser valores que me han llevado a ser quien soy ahora.

A mis hermanos, para que este trabajo sirva de modelo y recuerden que los sueños y metas que tenemos se logran mediante esfuerzo y constancia.

Santiago Proaño

## Dedicatoria

Nuestra tesis la dedico a todos mis familiares que confían en mí, en quienes me ven como un ejemplo a seguir, que con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr si lo persigues con muchas ganas al final encuentras una felicidad y una plenitud llena de gozo.

Marlon Rubio

## Introducción

En el Ecuador el área cultivada de café está representada por 34.789 hectáreas (ESPAC, 2020) de las cuales el 52% corresponde a café arábica y el 48% a café robusta (Guilcapi, 2018). Con respecto a la Amazonía, en el cantón Morona la superficie de este cultivo ocupa 277 hectáreas mismas que se distribuyen en 190 fincas (Barba I., comunicación personal, 14 de agosto de 2021).

La producción en el año 2020 a nivel nacional de café fue de 5.280 Tm (ESPAC, 2020), mientras que el rendimiento de café arábica reportado durante el año 2016 y 2017 en Morona Santiago fue de 0.23 t/ha (Guilcapi, 2018). Según la Asociación Nacional de Exportadores de Café (ANECAFE, 2021) el país generó 68 millones de dólares para el año 2020, mientras que a nivel local, en la provincia de Morona Santiago el valor de un quintal de café de tostadería de especialidad oscila entre los 100 y 140 dólares (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2020).

Este cultivo a nivel nacional provee de empleo a 105.000 familias productoras, así como para 700.000 familias asociadas a los procesos de comercialización, industrialización, transporte y exportación (Valverde *et al.*, 2020). En la Amazonia el cultivo de café se ha posicionado como una de las principales fuentes de ingresos de varias familias colonas he indígenas, y en la provincia de Morona Santiago no es la excepción, ya que el cultivo de café se ha consolidado como actividad adicional para los medios de vida de los productores (Guilcapi, 2018).

Existen varios factores que afectan la producción a nivel de campo, dentro de ellas el control de plagas y enfermedades (Guilcapi, 2018). La plaga de mayor importancia económica a nivel mundial es *Hypothenemus hampei*, también conocida como la broca del café (Noboa & Quelal, 2015). Esta plaga es capaz de destruir los frutos formando túneles y galerías en donde deposita sus huevos (Loyola & Rodríguez, 2020). Se estima que los daños en cosecha por esta plaga oscilan entre el 60% y el 80% de la producción (Fischersworing & RoBkamp, 2001) ocasionando pérdidas económicas de más de 500 millones de dólares por año a nivel mundial (Castrillón *et al.*, 2017).

Los hongos entomopatógenos son la causa más común de las enfermedades microbianas en insectos, puesto que se encuentra en una amplia gama de hábitats, incluidos entornos agrícolas y urbanos (Qu & Wang, 2018). Estos microorganismos infectan a los artrópodos y tienen un impacto mínimo en los ecosistemas naturales (Gasmi *et al.*, 2021). El género *Beauveria* ha sido el más estudiado a nivel mundial como controlador de poblaciones de insectos plaga debido a su probada eficiencia y su fácil reproducción (González *et al.*, 2015).

Se ha determinado que existen cepas lo suficientemente agresivas para causar un 100% de mortalidad a nivel de laboratorio (A. Bustillo, 1993), mientras que a nivel de campo se logró obtener un 60.33% de mortalidad (Fernández, 2020) además se ha corroborado que el control de *H. hampei* con cepas nativas de *Beauveria* spp. es mayor en comparación con cepas comerciales, del mismo modo la persistencia de las cepas nativas en el en campo es mayor (Bayman *et al.*, 2021).

La Estación Experimental Central de la Amazonía ha desarrollado tecnología relacionada con el manejo orgánico de café empleando cepas de *Beauveria* spp. como biocontrolador en cafetales de la región amazónica, específicamente en el cantón La Joya de los Sachas, provincia de Orellana, en donde se determinó que el entomopatógeno *Beauveria* spp. contribuye al control de la broca encontrando 5,19 brocas por rama infectadas con *Beauveria* spp. reduciendo en un 13,84% la infestación de broca con un manejo orgánico (Pico *et al.*, 2018).

## Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar aislados de *Beauveria* spp. como biocontrolador de broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) en las principales zonas cafetaleras del cantón Morona.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar morfológicamente cepas de *Beauveria* spp. en condiciones de laboratorio.
2. Evaluar la patogenicidad de las cepas de *Beauveria* spp. sobre la broca del café en condiciones de laboratorio.



## Revisión bibliográfica

### 3.1 El cultivo de café

El café encuentra su origen en las tierras de Abisinia, actual Etiopía (Figuroa *et al.*, 2015), llegando al continente americano en el siglo XVII como medio para generar ingresos en el rubro agrario (Rice, 2003). Sus frutos son uno de los principales productos de origen agrícola que se comercializan en los mercados internacionales y por lo general son una gran contribución a los rubros de exportación de aquellas regiones productoras (Cajape, 2020). Esta especie llegó, según historiadores, al Ecuador desde Colombia en el año de 1832 (Rodríguez, 2009). Hoy en día, su producción se encuentra presente en 23 de las 24 provincias del país (Aspiazu *et al.*, 2009) destacándose en las provincias de Manabí, particularmente en Jipijapa, Loja y estribaciones de la Cordillera Occidental de los Andes (Valverde *et al.*, 2020).

De acuerdo a su diversidad, en el país existen una gran cantidad de especies de café, entre las más importantes se tiene el café robusta y el café arábigo. La primera variedad conocida por su nombre científico *Coffea canephora*, fue introducido a Ecuador en el año de 1943 en la Estación Experimental Pichilingue (Miranda & Silva, 2019). Su cultivo trascendió más allá de la región costera, llegando a varias zonas de la amazonia como son las provincias de Napo, Sucumbíos, y Orellana (INIAP, 2003). La segunda variedad, *Coffea arábica*, ingresó al país en el año 1830, empezándose a cultivar en los recintos Las Maravillas y El Mamey, del cantón Jipijapa, provincia de Manabí. No obstante, en la actualidad, su cultivo tiene un mayor impacto en la provincia de Morona Santiago, al ser consolidado como una actividad importante para los productores (Guilcapi, 2018).

El Proyecto de Reactivación del Café y Cacao Fino de Aroma tenía como objetivo implementar para el año 2016 un total de 1.864 hectáreas de café (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2020); sin embargo, se conoce que en la actualidad en el cantón Morona la superficie de este cultivo ocupa 277 hectáreas, mismas que están distribuidas en 190 fincas (Barba I., comunicación personal, 14 de agosto de 2021). Para el año 2020 en Morona Santiago se comercializaron más de 440 quintales de café de especialidad. El precio por quintal de café oscila entre los 100 y 140 dólares (MAG, 2020).

### 3.2 Principales plagas y enfermedades del cultivo de café

Las principales enfermedades de los cafetos están dadas por hongos, virus, bacterias y nematodos, dentro de estos, la más importante es la roya causada por el hongo *Hemileia*

*vastatrix*, mientras *Hypothenemus hampei*, también conocido como la broca del café es el insecto plaga que causa mayores daños en este cultivo (Noboa & Quelal, 2015).

### 3.2.1. La broca del café (*Hypothenemus hampei*)

*Hypothenemus hampei* es un coleóptero perteneciente a la familia Curculionidae, conocido comúnmente 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 (Bustillo, 2006). Este insecto fue reportado en Ecuador por primera vez en el año de 1981 en la provincia de Zamora Chinchipe (Fernández, 2020), en donde, en tan solo 2 años logró distribuirse e infestar a varias zonas cafetaleras correspondientes a Loja, El Oro, Pichincha Manabí y Napo, convirtiéndose así en la principal plaga del café en el país (Jaramillo, 2019).

### 3.2.2. Clasificación taxonómica de la broca del café

En la Tabla 1 se presenta la clasificación taxonómica de la broca del café.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la broca del café.

<b>Reino:</b>	Animal
<b>Phylum:</b>	Arthropoda
<b>Clase:</b>	Insecta
<b>Orden:</b>	Coleoptera
<b>Familia:</b>	Curculionidae
<b>Subfamilia:</b>	Scolytinae
<b>Genero:</b>	Hypothenemus
<b>Especie:</b>	<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari)

**Nota:** la tabla presenta los diferentes tipos de taxones donde pertenece la broca del café. Tomado de *Ciclo biológico de la broca del café (Hypothenemus hampei (Ferrari 1867), en condiciones de laboratorio en Tingo María*. Por Arias, 2014, *Universidad Nacional Agraria de la Selva*.

### 3.2.3. Daños e importancia económica

La broca del café es considerada como plaga clave y de mayor importancia económica a nivel mundial en el cultivo del café. Los daños que ocasiona esta plaga se ven reflejados en el valor comercial de este producto. Se ha determinado que esta plaga causó pérdidas por más de 300 millones de dólares en Brasil (Assis *et al.*, 2020), mientras que a nivel mundial esta cifra asciende a 500 millones de dólares anuales (Lezaun, 2016). Wegbe *et al.*, (2003) mencionan que las pérdidas de peso ocasionadas por *H. hampei* son proporcionales a las tasas de

ataque. Si no se implementan las medidas de control adecuadas, las pérdidas de peso en el grano pueden llegar hasta un 50% (Montoya, 1999).

Según Damon (2000) *H. hampei* causa tres tipos de pérdidas económicas:

1. Los adultos y sus larvas provocan una reducción en el rendimiento y la calidad del producto final debido a que forman galerías en la cereza del café para alimentarse.
2. Debido a los daños físicos que causa este insecto en las cerezas maduras atacadas se tornan susceptibles a diferentes infecciones y contaminaciones.
3. Estos insectos pueden atacar las cerezas inmaduras cuando no disponen de suficiente alimento, por ende, aumentan su porcentaje de infestación.

### 3.3. Manejo de plagas del cultivo de café

El control de la broca del café se realiza mediante un manejo integrado que comprende: el control cultural, el control etiológico o trampeo, el control químico y el control biológico (IICA, 2019).

El control cultural se basa en las labores agrícolas de campo que permitan reducir la población de este insecto (Alejos & Valverde, 2020). Dentro de estas prácticas se encuentra la recolección manual de frutos caídos, eliminación de malezas, fertilización, eliminación de cafetales decadentes o abandonados y regulación de la sombra para la entrada de más luz (Arias, 2018).

El control etológico se basa en el empleo de trampas que controlen a esta plaga (Leiva *et al.*, 2019). Estudios como los realizados por Mendoza *et al.* (2021) y Fernández & Cordero (2005) demuestran que las trampas son eficientes para determinar la época de vuelo de esta especie, advirtiendo a los caficultores sobre los peligros del insecto en un momento dado (Marrero *et al.*, 2011).

El control químico se basa en la aplicación de insecticidas como productos a base de abamectina (Jaramillo, 2019). Este método debe emplearse como último recurso cuando las poblaciones de la broca sean altas. Su utilización debe ser dirigida a los focos de infestación (IICA, 2019).

#### 3.3.1 Control alternativo de *H. hampei*

Se ha estudiado el control alternativo de *H. hampei* mediante la introducción de parasitoides antagonistas como lo son: *Cephalonomia stephanoderis*, *Prorops nasuta*, *Phymastichus coffea* (Bustillo, 2018). Por otra parte, también se ha probado los efectos del biocida neem (*Azadirachta indica*) e higuera (*Ricinus communis*) para reducir las infestaciones y poblaciones de la broca (Alejos & Valverde, 2020). Sin embargo, dentro del control alternativo el uso de organismos entomopatógenos, el hongo *Beauveria bassiana*, es el más conocido y empleado (Rivera & Diaz, 2020).

### 3.4 El hongo *Beauveria* spp.

Los hongos entomopatógenos correspondientes al género *Beauveria* spp. son los más estudiados a nivel mundial como controladores de poblaciones de insectos plaga, esto debido a su probada eficiencia y su fácil reproducción (González, Alvarado, & Zepeda, 2015).

#### 3.4.1 Clasificación taxonómica de *Beauveria* spp.

En la Tabla 2 se presenta la clasificación taxonómica del hongo entomopatógeno.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Beauveria* spp.

<b>Reino:</b>	Fungí
<b>Phylum:</b>	Ascomycota
<b>Clase:</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase:</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden:</b>	Hypocreales
<b>Familia:</b>	Clavicipitaceae
<b>Genero:</b>	<i>Beauveria</i>

**Nota:** Caracterización taxonómica de *Beauveria* spp. tomado de NCBI taxonomy database.

Con relación a la variabilidad de especies de *Beauveria* spp. tenemos a: *B. amorpha*, *B. asiática*, *B. australis*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. caledonica*, *B. hoplocheli*, *B. kipukae*, *B. lii*, *B. malawiensis*, *B. pseudobassiana*, *B. sungii*, *B. varroae* y *B. vermiconia* (Castrillo & Wheeler, 2020) cada una de estas especies tienen diferentes características morfológicas describiéndose como color, borde, aspecto de la colonia y pigmentación del medio (Castillo *et al.*, 2014).

### 3.4.2 Hospederos

*Beauveria* spp. se la puede encontrar de forma natural el suelo y en ciertas plantas, tiene preferencias por climas templados y húmedos. Su amplia lista de hospederos incluye mariposas, áfidos, moscas blancas, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, hormigas y chinches. Se ha encontrado que ataca a 200 o más especies de insectos con un predominio de Coleoptera, Lepidoptera, Auchenorrhyncha, Sternorrhyncha y Heteroptera (Sponagel, 1994).

Existen diferentes cepas de *Beauveria* que presentan una gran variación en cuanto a virulencia, patogenicidad y rango de hospederos (Nicholls, 2008). Dentro de estas cepas, las más utilizadas como agentes de biocontrol tenemos a: *B. bassiana*, *B. brongniartii* y *B. tenella* (Motta & Murcia, 2011).

### 3.5 Clasificación morfológica

La caracterización morfológica permite identificar cepas, seleccionar diferentes genotipos mediante aislamientos limitados geográficamente a una región en particular, definir genotipos a partir de aislamientos con potencial para el control biológico de *H. hampei* (Vélez *et al.*, 2001).

#### 3.5.1 Características Macroscópicas

*Beauveria* spp. se caracteriza por presentarse como un algodón blanco, mismo que se tornan amarillento o de color rosa pálido, al pasar los días el crecimiento de la colonia toma un aspecto polvoriento color crema. En el insecto, el micelio crece en el exoesqueleto formando una cubierta algodonosa que tiene un color blanco en la superficie (Capek & Fassatióvá, 1977). Las colonias in vitro comprenden un diámetro que oscilan entre los 6 mm a 23 mm por un alto de 5 mm en un lapso de 8 días, se diferencian por su aspecto lanoso, flocoso, polvoriento o aterciopelado con algunas rarezas que presentan sinnemas, también se las diferencia mediante su forma, elevación, margen, superficie y color como se presenta en la Imagen 1 (Husseini, 2019).

**Imagen 1.** Formas y características del hongo *Beauveria* spp.

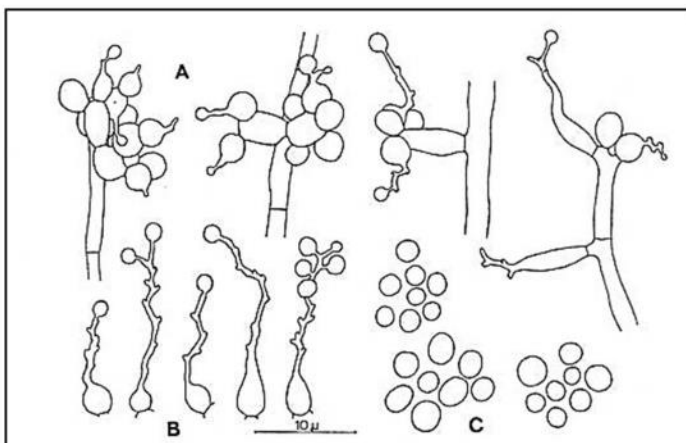
Forma	Elevación	Margen o borde	Superficie	Pigmento anverso
circular 	plana y extendida 	liso o entero 	plegada 	rojo 
irregular 	elevada y limitada 	ondulado 	sectorizada 	violeta 
filamentosa 	convexa umbilicada 	lobado 	cerebriformes 	amarillo 
rizoidal 		desflechado 	con surcos radiales 	marrón 

**Nota:** Extraído de Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, (Piccoli *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Características Microscópicas

Humber (2005) señala que las cepas de *Beauveria* spp. presentan una estructura diferenciada, sus hifas por lo general son septadas y hialinas con paredes lisas entre 1.5  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  de ancho, dependiendo su variedad. En los aislamientos frescos el aparato conidial aparece agrupado al contrario en cepas antiguas se encuentran menos asociadas y más distribuidas, las células conidiógenas tienden a presentarse en grupos pequeños o en solitarios, usualmente de 1 a 5 células de igual manera dependiendo su variedad (Imagen 2).

**Imagen 2.** Estructuras microscopias de *Beauveria* spp.



**Nota:** A. aparato conidial, B. células conidiógenas, C. conidias

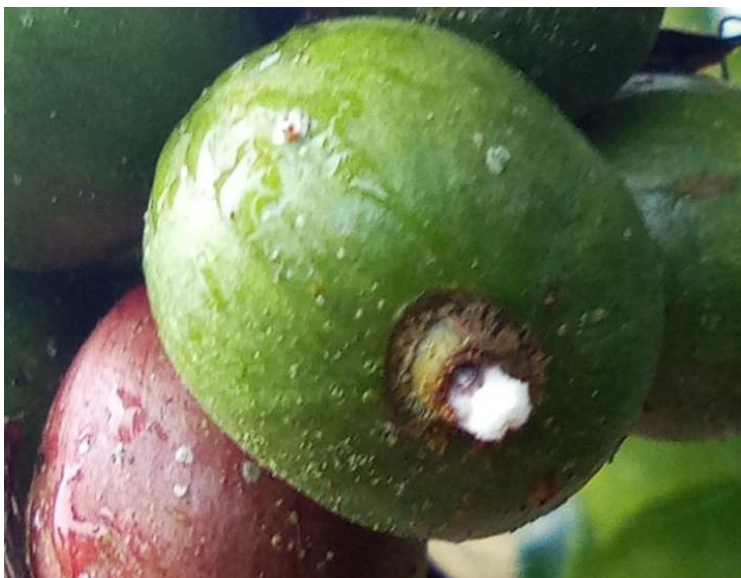
**Fuente:** Hoog (1972)

### 3.6 Mecanismo Patogénico

El hongo inicia su proceso infeccioso cuando las esporas se establecen en el área del integumento del insecto, donde germinan y comienza a excretar enzimas como las quitinasas, proteasas, lipasas, quitobiasas, y lipooxigenasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y así continúan con el proceso de penetración por presión mecánica donde comienza por una estructura especializada del tubo germinativo llamada apresorio. Una vez dentro del insecto, el hongo logra su desarrollo como cuerpos hifales que se van esparciendo a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, tubos de Malpighi, cuerpos grasos, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección (Pucheta *et al.*, 2006).

*Beauveria* spp. relacionándolo *H. hampei* inicia su proceso infeccioso cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento del insecto, mientras encuentran un espacio idóneo para establecer la asociación patógeno-hospedero y empezar a colonizarlo (Jones, 1994). Haro (2013) menciona que el ciclo de esta asociación comprende tres fases: la primera, es la adhesión y germinación de la espora viable en la cutícula del insecto, la segunda, es la penetración en el hemocele y en la tercera se desarrolla el hongo, al culminar la infección la broca del café muere y se desarrolla sus cuerpos fructíferos como se observa en la Imagen 3.

**Imagen 3.** Broca del Café infectada con *Beauveria* spp.



**Nota:** la imagen presenta al hongo entomopatógeno infectando al insecto en la cereza de café.

Elaborado por los Autores.

Bustillo (2001) señala que la germinación de las conidias de *Beauveria* spp. en condiciones favorables, se produce en aproximadamente 12 horas después de la inoculación y, en el lapso de 72 horas, el insecto está totalmente colonizado.

### 3.7 *Beauveria* spp. como controlador de *Hypothenemus hampei*

*Beauveria bassiana* es un controlador natural de *H. hampei* (Posada & Bustillo, 1994). Estudios de laboratorio demostraron que *B. bassiana* es el hongo más virulento para *H. hampei*, lo que sugiere que este puede desempeñar un importante papel como agente de control biológico de *H. hampei* (Murphy, 1990). Sponagel (1994) reveló que en Ecuador *B. bassiana* tiene una virulencia notable en condiciones controladas, sin embargo, también determinó que a nivel de campo no hay diferencia entre las parcelas de control y experimentales debido a factores climáticos en su mayoría, puesto que los mismos no permiten que el hongo se adapte y cause una infección.

La eficacia de *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café está influenciada por la calidad y concentración del hongo, condiciones climáticas y el manejo del cultivo. Los niveles de control pueden fluctuar desde valores muy bajos cercanos al 20% a niveles altos del 75% (Bustillo & Marin, 2002). Cárdenas, Villalba, Bustillo, Montoya, & Góngora (2007) aseguran que, desde una vista más biológica, la mortalidad del 66.63% obtenida sobre la broca del café, es un resultado significativo, que muestra la eficacia del entomopatógeno.

La estación Experimental Central de la Amazonia ha desarrollado tecnología relacionada con el manejo orgánico de café empleando cepas de *Beauveria* spp. como biocontrolador en cafetales de la región amazónica, específicamente en el cantón La Joya de los Sachas, provincia de Orellana, en donde se determinó que el entomopatógeno *Beauveria* spp. contribuye al control de la broca empleando un manejo orgánico (Pico *et al.*, 2018). De la misma forma en la Amazonia Ecuatoriana se ha establecido que la presencia del hongo *B. bassiana* es notable en aquellos cafetales donde la infestación de *H. hampei* es mayor (Piato *et al.*, 2018).

Estudios más recientes realizados en Puerto Rico dan a conocer que tanto aislamientos locales como comerciales de *B. bassiana* son igual de virulentos; sin embargo, la persistencia del aislado comercial no es la suficiente, debido a que el tiempo requerido para que actúe en contra del insecto es mayor, mientras que los aislados locales se adaptan con mayor facilidad a las condiciones medioambientales y son más eficientes al paso del tiempo (Bayman *et al.*, 2021).



Por otra parte, ensayos de campo en Colombia relacionados con la aplicación de conidias de *B. bassiana* a las cerezas caídas resultó en una infección de broca del 30 al 40% y redujo la posterior infestación de árboles hasta en un 50% (Bustillo, Bernal, Benavides, & Chaves, 1999). De igual manera, Benavides, Góngora, & Bustillo, (2012) encontraron que una mezcla de cepas de *B. bassiana* causó una mortalidad de la broca del 60% al 66%.

La capacidad biopesticida de *B. bassiana* contra *H. hampei* se demuestra en el estudio realizado por Fernández, (2020) quien obtuvo un porcentaje de mortalidad del 60.33% transcurridos 4 días de la inoculación, mientras que al cabo de dos días más, la mortalidad llegó a un 96.66%. Assis *et al.* (2020) demostró la efectividad de *B. bassiana* para controlar *H. hampei* a nivel de campo obteniendo un 40.62% de mortalidad de adultos de *H. hampei* en un lapso de 12 días.

El hongo *B. bassiana* tiene diferentes cepas y aislados originarios de distintos países, dentro de los cuales existen cepas predominantes como la cepa “Bb9205”. Esta cepa es considerada como el aislamiento con las mejores características por su alta producción de esporas, virulencia y rápida mortalidad de la broca del café (Arcila *et al.*, 2006). Cárdenas, Villalba, Bustillo, Montoya, & Góngora (2007) demostraron que el empleo de la cepa “Bb9205”, causa entre el 90% y el 100% de mortalidad en el laboratorio, y entre el 30% y el 60% de mortalidad en el campo.

Las cepas de *B. bassiana* causan a nivel de campo entre un 20% y 25% de mortalidad en adultos de *H. Hampei*, no obstante, la actividad de los residuos de este entomopatógeno disminuye con el paso del tiempo (Wraighta *et al.*, 2021).

En el estudio de Siahaan, Supriana, & Iskandarini, (2021) se evaluó la relación que tiene el efecto de los fertilizantes, el uso del entomopatógeno *B. bassiana* y la mano de obra con relación a los ingresos de los caficultores. Concluyen que tanto la fertilización y el uso de *B. bassiana* tiene un efecto significativo positivo en la producción de café, no obstante, este efecto significativo positivo se da en aquellos caficultores que aplican de manera intensiva este biopesticida.

### **3.8 Evaluación de la efectividad de *Beauveria* spp.**

La evaluación de la capacidad biopesticida se valora con base en el porcentaje de mortalidad, la dosis letal (DL), concentración letal (CL) y tiempo letal (TL) (Fernández, 2020). En el transcurso de las investigaciones en el campo se han demostrado que a medida que se incrementa la concentración de esporas se obtiene una mayor mortalidad en poblaciones de

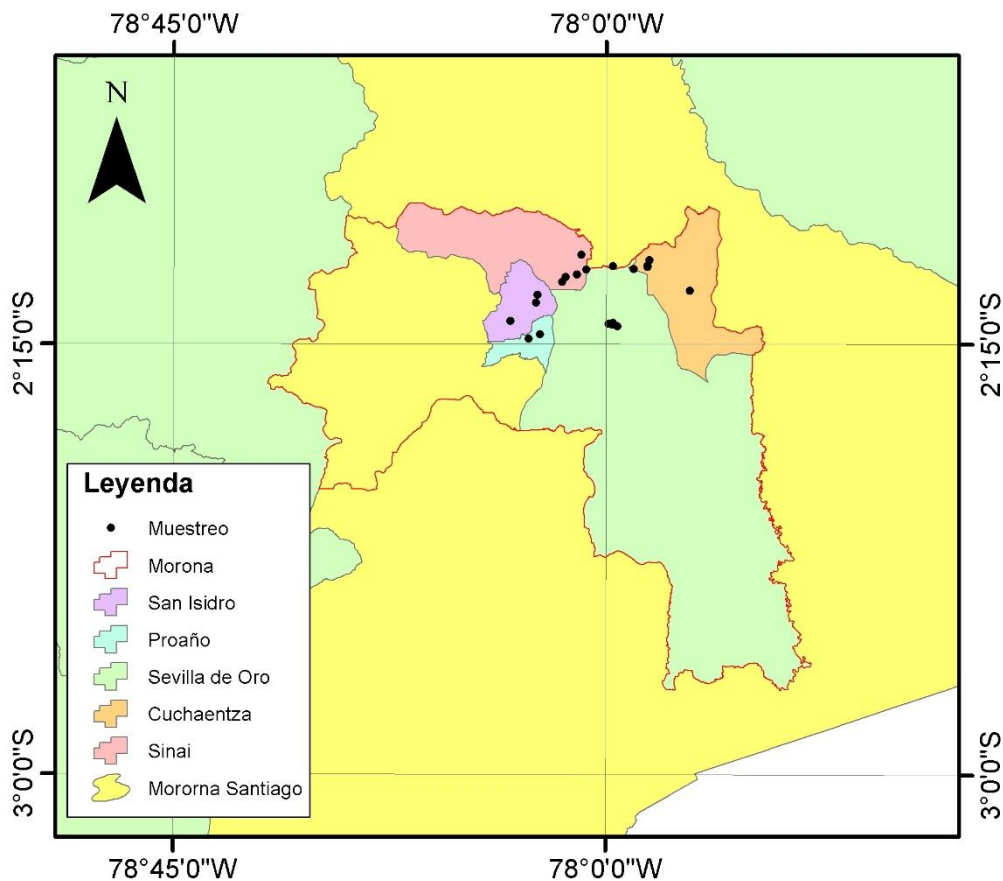
*H. hampei*. Se considera que una concentración de  $1 \times 10^9$  esporas por planta es la más óptima (Bustillo, 2002). La efectividad de *Beauveria spp.* en condiciones de laboratorio y de campo se mide en la tasa de mortalidad de *H. hampei*, en la colonización y en la virulencia del entomopatógeno que ataca al insecto (Posada & Vega, 2006).

## Materiales y métodos

### 4.1 Área de estudio

Para el presente trabajo de investigación se recolectaron muestras en distintas fincas de café ubicadas en el cantón Morona, principalmente en las parroquias Cuchaentza, General Proaño, San Isidro, Sinaí y Sevilla Don Bosco, provincia de Morona Santiago.

**Imagen 4.** Mapa de Zonas muestreadas dentro del cantón Morona.



Elaborado por los Autores.

### 4.2 Materiales

Para desarrollar el presente trabajo de investigación se emplearon materiales físicos, químicos, biológicos e Informáticos.

#### 4.2.1 Material Físico

GPS, clinómetro, smartphone, tarrinas plásticas ½ litro, fundas plásticas de 2 x 8 pulgadas, espuma fenólica, etiquetas, hojas de campo, cooler, microscopio, estéreo microscopio, cámara Lumenera Infinity 1, cámara de flujo laminar, autoclave, estufa de calor en seco,

destilador de agua, balanza analítica, micropipetas, computador portátil, refrigerador, asa de cultivo, bisturí, caja petri, cámara de neubauer, cinta, cronómetro, tubos de plástico de 10 ml, eppendorf de 5 ml, marcadores de vidrio, etiquetas, guantes de laboratorio, hojas de registro, jeringa, mandil de laboratorio, papel filtro estéril, papel toalla, parafilm, porta y cubre objetos, alcohol, algodón hidrófilo, papel aluminio, tijera, equipo de bioseguridad.

#### 4.2.2 Material Biológico

Aislados del hongo *Beauveria* spp., insectos adultos de brocas de café (*H. hampei*), cerezas de café especie arábica.

#### 4.2.3 Material Químico

Ácido láctico, agar, dextrosa, agua destilada, azul de lactofenol, clorotalonil (Daconil), hipoclorito de sodio al 5%, propargite (Omite), Tween 80, hielo.

#### 4.2.4 Material Informático

Aplicación móvil HabitApp, Excel, InfoStat versión 2020e, ArcGIS e Infinity analyze.

### 4.3 Metodología

El trabajo de investigación se dividió en dos fases, la primera denominada fase de trabajo de campo y la segunda trabajo de laboratorio.

#### 4.3.1 Metodología del primer objetivo específico (Identificar morfológicamente cepas de *Beauveria* spp. en condiciones de laboratorio)

##### 4.3.1.1 Recolección de las muestras

Se visitaron un total de 20 fincas de café ubicadas en el cantón Morona. Dentro de cada finca se tomó información relevante para el estudio como lo es la ubicación geográfica, altitud, variedad de café, porcentaje de sombreado, características del escenario y porcentaje de infestación. Finalmente, en cada una de las fincas se recolectaron las muestras de brocas adultas infectadas con *Beauveria* spp. (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE), 2022).

Dentro de cada finca se recolectaron diez insectos infectados con el hongo al azar (MAATE, 2022). Los insectos fueron colocados en fundas plásticas de 2 x 8 pulgadas y dispuestas en una tarrina de medio litro de capacidad que contenía en su interior una esponja fenólica. Para

asegurar su conservación, las tarrinas fueron transportadas en un cooler que contenía hielo en su interior.

#### 4.3.1.2 Aislamiento del Hongo

Una vez ingresadas las muestras en el laboratorio se sembró el insecto infectado (muerto) con el hongo en medio PDA (Papa Dextrosa Agar). Dicho medio fue preparado con 39 g de Millipore PDA en un litro de agua destilada, el medio se lleva a esterilización en el autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. El medio de cultivo fue dispensado en cajas Petri dentro de la cámara de flujo.

En la cámara de flujo laminar se extrajo cuidadosamente el insecto infectado y se colocó en las cajas Petri cuyo interior contenían medio PDA.

Las cajas fueron incubadas a 25°C durante 5 días, trascurrido este lapso de tiempo se realizó una identificación visual y microscópica descartando aquellas muestras que no correspondían a *Beauveria* spp. y aquellas muestras contaminadas.

Se resembraron las muestras en medio PDA con la finalidad de obtener un cultivo más puro. Las muestras fueron incubadas a 25°C, pero en esta ocasión por un lapso de 25 días.

Posteriormente se realizó un cultivo monospórico en un medio agar agua. Para ello en un litro de agua se colocó 10 g de agar agar, se llevó a punto de ebullición y se esterilizó el medio en la autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, se dejó reposar para que se enfriara y se dispensó en cajas petri.

Se realizó una suspensión de esporas tomando una pequeña porción del hongo y colocándola en un tubo de ensayo el cual contenía 5 ml agua destilada esterilizada en la autoclave a 15 bares de presión por 15 minutos. Finalmente, se taparon los tubos de ensayo y se mezcló el hongo con el agua en un vortex. Todo este procedimiento se ejecutó dentro de una cámara de flujo laminar.

Una vez obtenido el medio de cultivo y la solución del hongo con una micropipeta y puntillas esterilizadas se tomó 0,2 µL de la solución y esta se colocó en el medio de agar agua, todo este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

Se realizaron observaciones constantes en el microscopio, al cabo de 24 horas germinaron las esporas y se procedió a realizar la pesca de la espora y sembrarla en medio PDA para evaluar el desarrollo del hongo.

#### 4.3.1.3 Caracterización Macroscópica

Para la caracterización macroscópica se resembró del hongo en medio PDA y se mantuvo el mismo en desarrollo durante 15 días en una cámara de humedad a 25°C y a un 80% de HR, pasado este tiempo se evaluó la forma, la elevación, la textura del micelio y color anverso y reverso, la superficie y la presencia de sinnemas. Se tomaron fotografías de cada una de las cajas evaluadas y los datos levantados fueron registradas en una hoja de Excel para su posterior análisis.

#### 4.3.1.4 Caracterización Microscópica

Previo a la caracterización microscópica se instaló y configuró el software Infinity Analyze el cual nos permitió hacer uso de la cámara Lumenera Infinity 1, misma que nos facilitó la toma de mediciones de las microestructuras del hongo.

Para la caracterización microscópica se resembró del hongo en medio PDA mismo que se mantuvo en una cámara de humedad a 25 °C y a un 80% de HR durante un período de 5 días, transcurrido este tiempo se observaron las estructuras principales del hongo como lo son las conidias, conidióforos y fiálides.

Para observar dichas estructuras en el microscopio se tomó una porción de hongo y se realizó un método de tinción el cual consistió en colocar una gota de azul de metileno en un portaobjeto sobre este una cinta que contenía las estructuras del hongo. Finalmente, las estructuras se observaron en el microscopio y fueron medidas con ayuda del software Infinity Analyze.

#### 4.3.1.5 Análisis de los datos

Para determinar la similitud entre las cepas identificadas se realizó un análisis de conglomerados utilizando el método de separación Ward y distancia Euclídea. Las variables cualitativas como la forma, la elevación, la textura del micelio, color anverso y reverso, la superficie y la presencia de sinnemas se transformaron en variables dummy. Previo este análisis todas las variables se estandarizaron. Para formar los grupos se consideró el 50% de la distancia de similitud.

#### 4.3.2 Metodología del segundo objetivo específico (Evaluar la patogenicidad de las cepas de *Beauveria* spp. sobre la broca del café en condiciones de laboratorio)

#### 4.3.2.1 Recolección y cría del insecto para la evaluación de patogenicidad

Para establecer el pie de cría se recolectaron al azar adultos de *Hypothenemus hampei* que no estén infectados con *Beauveria* spp. dentro de la zona correspondiente a Domono (MAATE, 2022), los mismos fueron transportados al Insectario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, los frutos fueron lavados y desinfectados con propargite más clorotalonil a una solución de 1 mL de producto por 1 litro de agua.

Las cámaras de cría constaron de tarrinas plásticas de ½ litro de capacidad, en las cuales se colocó espuma fenólica, mismas que sirvieron para mantener la humedad dentro de la tarrina. Se colocaron las cerezas brocadas con insectos adultos de *Hypothenemus hampei* y cerezas sanas que se utilizaron de alimento. Las cámaras de cría fueron colocadas dentro de un bioclimático a una temperatura de 25°C y 80% HR. Se realizó la revisión de las cámaras de cría por un lapso de 30 días y cada 5 días se realizaba la aspersion de agua destilada con un atomizador para mantener la humedad.

Aquellas cerezas que mostraban signos de descomposición eran desechadas y remplazadas con cerezas de café frescas. De igual manera aquellas brocas que se encontraban sin vida eran desechadas para evitar la proliferación de alguna enfermedad.

Al cabo de 28 días se pudo observar los adultos recién emergidos correspondientes a la F1 de *H. hampei*. Se obtuvieron un total de 500 insectos.

#### 4.3.2.2 Determinación de la concentración de conidias

Para la evaluación de la capacidad biopesticida se realizaron diluciones de los 10 aislados seleccionados en el análisis de conglomerados.

Para la determinación de la concentración de conidios nos basamos en la metodología propuesta por Báez *et al.*, (2019) con algunas variaciones propuestas por el departamento de Sanidad Vegetal de la Estación Experimental Central de la Amazonia – INIAP.

Se sembró cada uno de los aislados de *Beauveria* spp. en cajas petri individuales en medio PDA. Al cabo de 10 días se extrajo una porción del hongo con un sacabocados de 1 cm y se adicionó a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada, se agitó manualmente durante 30 segundos. Esta suspensión obtenida corresponde a la solución madre.

De dicha dilución madre se tomó 30 µL y se la colocó en una cámara de Neubauer. Con ayuda del electromicroscopio en el objetivo 40x se contó los conidios.

#### 4.3.2.3 Evaluación de la capacidad biopesticida

Para la evaluación de la capacidad biopesticida se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA). Se establecieron 10 tratamientos a una concentración de  $1 \times 10^7$  más el control, cada tratamiento contó con 3 repeticiones.

En cajas petri, con papel absorbente en su interior, se colocó 10 adultos de *H. hampei* conjuntamente con media cereza de café. Cada tratamiento fue colocado en atomizadores manuales de 100 ml de capacidad. Se realizó una única aspersion de las cepas de *Beauveria* spp. sobre los adultos de *H. hampei*, se taparon las cajas petri y se colocaron en un bioclimático a 25°C y a un 80% de HR. Para el control se utilizó agua destilada. Este proceso se repitió tres veces por tratamiento.

Durante 15 días se registró el comportamiento cada uno de los adultos de *H. hampei*. Cuando se observaba un insecto muerto inmediatamente se los retiraba de la caja petri en donde se estaba realizando el ensayo y se lo colocaba en una cámara de humedad, la cual constaba de una caja petri con un portaobjeto y papel absorbente en su interior. Esto se realizaba para observar el desarrollo del hongo sobre el cuerpo del insecto.

Durante este periodo de tiempo se evaluó el porcentaje de mortalidad, el tiempo letal al 50% de la mortalidad el porcentaje de invasión de micelio y el porcentaje de colonización.

#### 4.3.2.4 Análisis de los datos

La variable mortalidad se analizó mediante pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y el tiempo letal al 50% ( $TL_{50}$ ) se determinó mediante un análisis probit.



## Resultados

## 5.1. Porcentaje de Infestación y número de cepas aisladas por finca

En las 20 fincas estudiadas se determinó la presencia de la plaga, sin embargo, en 7 fincas se observó una infestación menor al 1%. *Beauveria* spp. estuvo presente en 13 de las 20 fincas estudiadas. Se obtuvieron un total de 58 aislados del hongo.

En la Tabla 3 se puede observar el nivel de infestación de las distintas fincas analizadas en el trabajo de investigación, Cuchaentza es la parroquia más afectada por la plaga, de igual manera esta parroquia presenta el mayor número de aislados de *Beauveria* spp.

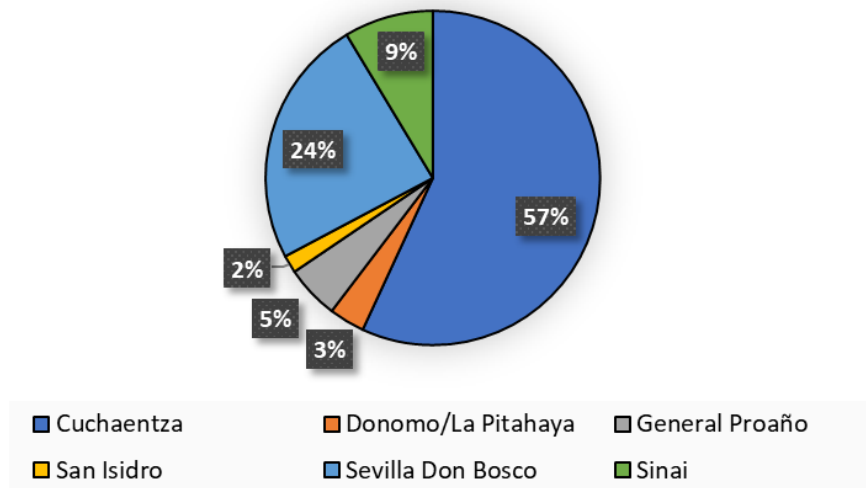
**Tabla 3.** Niveles de infestación de *H. hampei* y presencia del *Beauveria* spp.

Código	Parroquia	Presencia del hongo	Infestación (%)	Numero de cepas aisladas
MS-CU-001	Cuchaentza	Si	33.79	8
MS-CU-002	Cuchaentza	Si	22.96	6
MS-CU-003	Cuchaentza	Si	14.85	12
MS-CU-004	Cuchaentza	Si	5.79	1
MS-CU-005	Cuchaentza	Si	35.92	6
MS-DP-001	Domono/La pitahaya	Si	13.96	2
MS-EE-001	El Edén	No	0.36	0
MS-GP-001	General Proaño	Si	17.97	3
MS-SI-001	San Isidro	Si	18.99	1
MS-SI-002	San Isidro	No	0.2	0
MS-SE-001	Sevilla Don Bosco	Si	2.2	1
MS-SE-002	Sevilla Don Bosco	No	1.15	0
MS-SE-003	Sevilla Don Bosco	No	0.35	0
MS-SE-004	Sevilla Don Bosco	Si	16.8	6
MS-SE-005	Sevilla Don Bosco	Si	23.77	7
MS-S-001	Sinaí	Si	3.46	2
MS-S-002	Sinaí	Si	17.33	3
MS-S-003	Sinaí	No	0.73	0
MS-S-004	Sinaí	No	0.77	0
MS-S-005	Sinaí	No	0.87	0

Elaborado por los Autores.

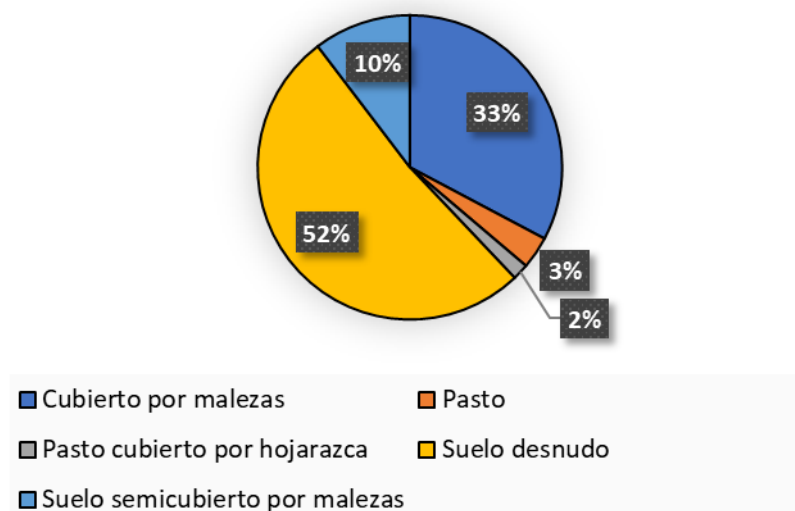
## 5.2. Análisis de frecuencias de las características de la zona

Con respecto a la procedencia de las muestras analizadas se determinó que de la parroquia Cuchaentza procede el mayor número de cepas con un 57% (Figura 1).



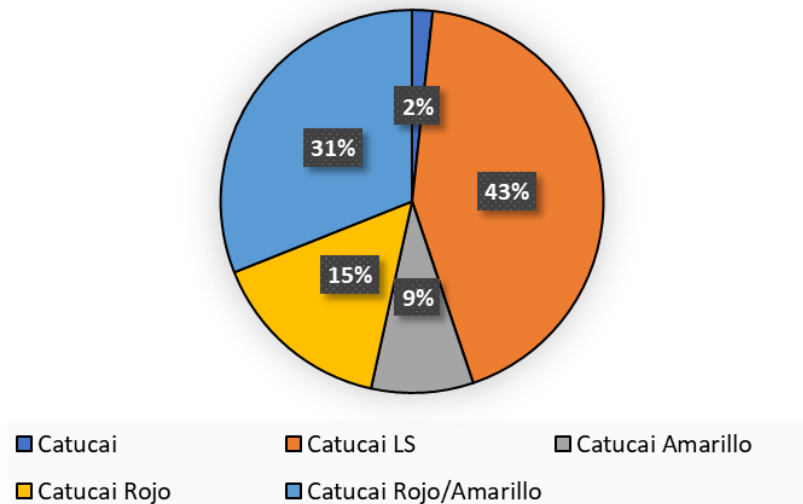
**Figura 1.** Frecuencia de las parroquias en las que se encontró el hongo *Beauveria* spp.

Con respecto a la vegetación circundante de las zonas de donde procedieron las muestras podemos decir que el 51% no presentaba ningún tipo de cobertura (Figura 2).



**Figura 2.** Frecuencia de la vegetación de las fincas en las que se encontró el hongo *Beauveria* spp.

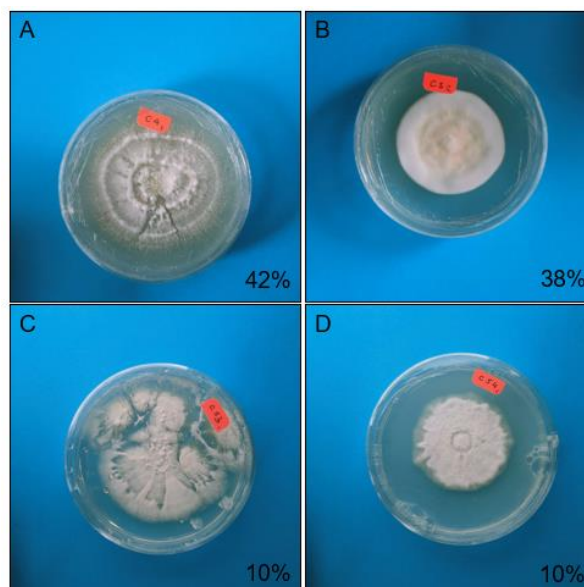
Con respecto a la diversidad de café sembrada en las zonas de las cuales proceden las muestras tenemos que la variedad Catucaí LS predomina con un 43% (Figura 3).



**Figura 3.** Frecuencia de las variedades de café en las que se encontró el hongo *Beauveria* spp.

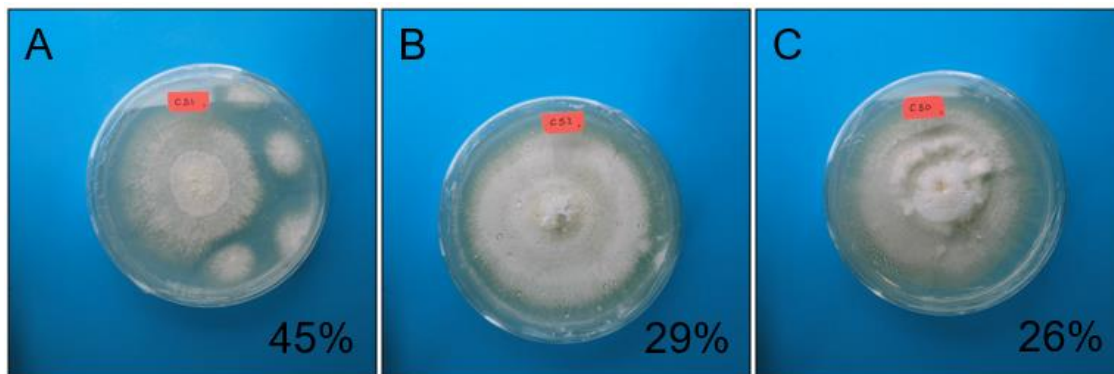
### 5.3. Análisis de las características macroscópicas

Con relación a las características macroscópicas tenemos que la forma irregular predominó con un 42% de las muestras encontradas en el estudio (Figura 4).



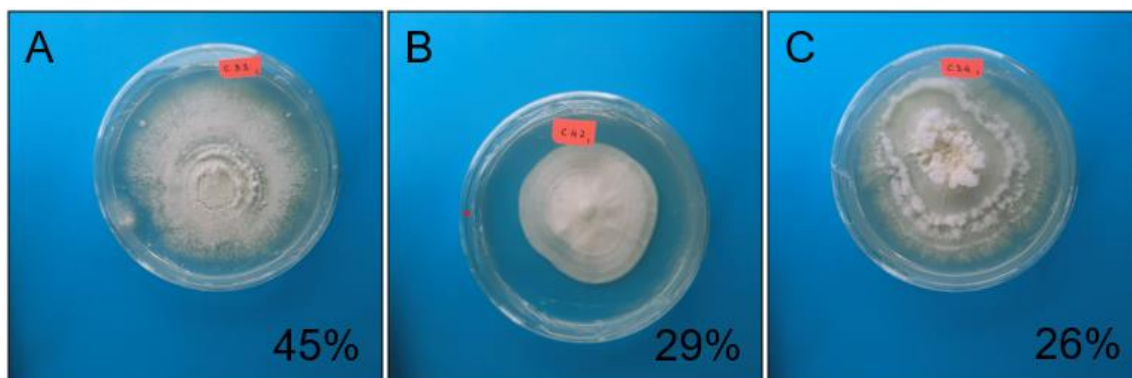
**Figura 4.** Frecuencia de las formas en del hongo *Beauveria* spp. (A) Irregular, (B) Circular, (C) Filamentosa, (D) Rizoidal.

La elevación más predominante fue la plana y extendida con un 45% (Figura 5).



**Figura 5.** Frecuencia de las distintas elevaciones del hongo *Beauveria* spp. (A) Plana y extendida, (B) Elevada y limitada, (C) Convexa umbilicada.

En la textura micelar podemos decir que la textura polvorienta fue la que prevaleció en mayor porcentaje con un 45% (Figura 6).



**Figura 6.** Frecuencia de las texturas del micelio del hongo *Beauveria* spp. (A) Polvorienta, (B) Aterciopelada, (C) Algodonosa.

Con relación al color anverso de la caja petri podemos decir que el color predominante fue el blanco con un 91% (Figura 7).

Color Anverso

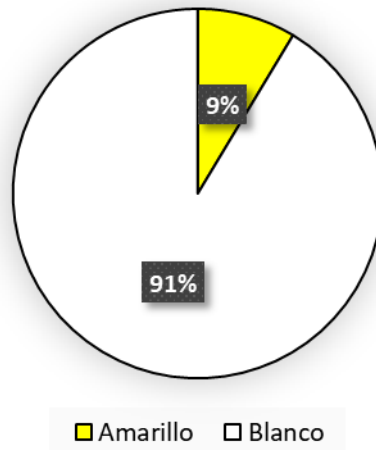


Figura 7. Frecuencia del color adverso de la caja petri que continua al hongo *Beauveria* spp.

En el color reverso de la caja se observó una mayor variabilidad de colores siendo el color amarillo y blanco los más predominantes, con el 35 y 34% respectivamente (Figura 8).

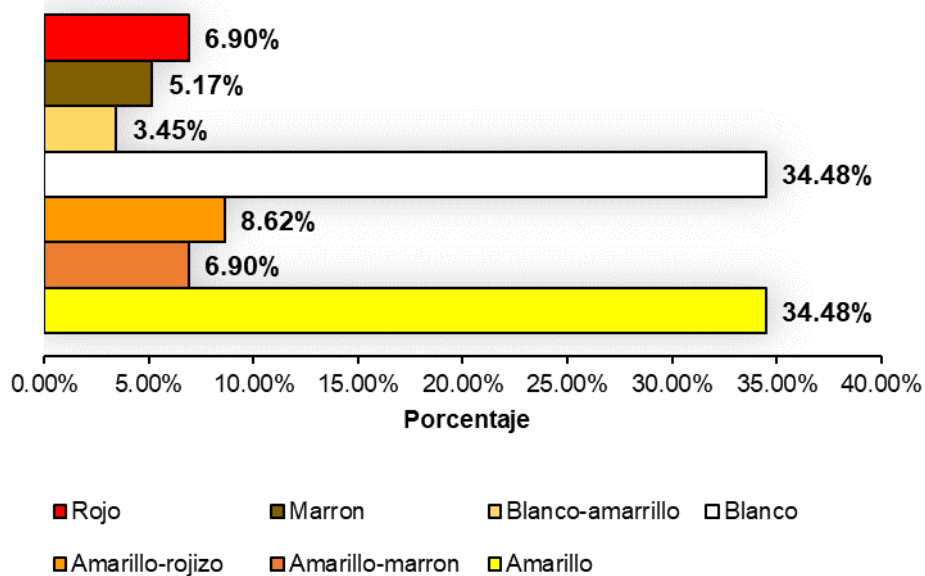
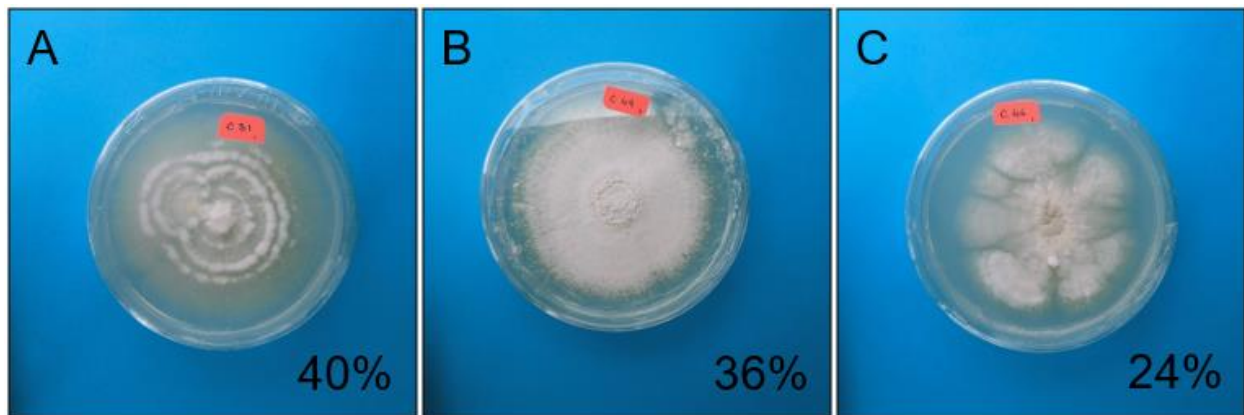


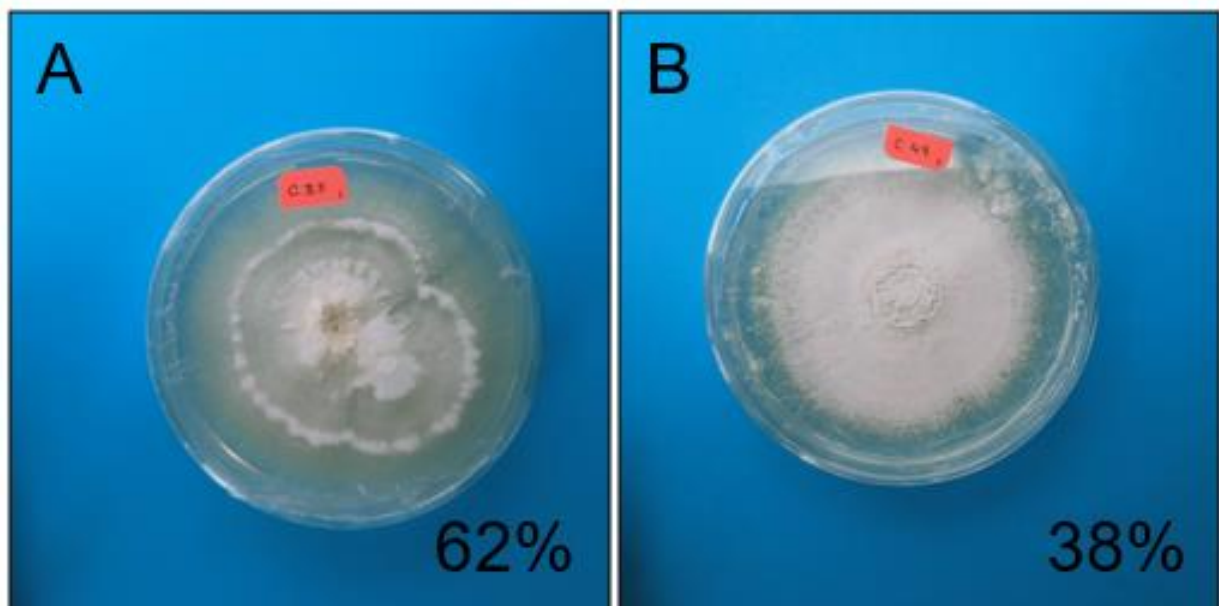
Figura 8. Frecuencia del color reverso de la caja petri que continua al hongo *Beauveria* spp.

En cuanto a la superficie del hongo podemos decir que el mayor porcentaje está representado por la superficie sectorizada con un 40%, seguida de la superficie plegada con un 36% y finalmente se encuentra la superficie con surcos radiales con un 24% (Figura 9).



**Figura 9.** Frecuencia de la superficie del hongo *Beauveria* spp. (A) Sectorizada, (B) Plegada, (C) con surcos radiales.

Con respecto a la presencia de sinnemas tenemos que un 62% de los aislados analizados presentaron estas estructuras mientras que el 38 % no lo hicieron (Figura 10).



**Figura 10.** Frecuencia de la presencia de sinnemas del hongo *Beauveria* spp. (A) Si, (B) No.

Para mayor información relacionada d las características macroscópicas ver el Anexo 16.

#### 5.4. Análisis de las características microscópicas

Con relación a las características microscópicas de manera general el tamaño de las conidias osciló entre 1.68  $\mu\text{m}$ , el tamaño de los conidióforos entre 22.21  $\mu\text{m}$  y el tamaño de las fiálides entre 8.15  $\mu\text{m}$  (ver Anexo 1, 8, 9 y 10).

#### 5.5. Análisis de Conglomerados

En el análisis de conglomerados utilizando la distancia euclídea presentó una correlación cofenética 0.811 y una correlación de Pearson más alta entre los conglomerados de las variables cuantitativas de laboratorio y todas las variables medidas con un valor de 0.93.

Se obtuvieron 58 cepas de *Beauveria* spp. las cuales se dividieron en 10 conglomerados o clusters mismos que fueron agrupados según sus características macroscópicas como: forma, elevación, textura del micelio, color anverso, color reverso, superficie y presencia de sinnemas, y sus características microscópicas: tamaño de fiálides, tamaño de conidióforos y tamaño de conidias. De igual manera se tomó en cuenta el porcentaje de infestación de las fincas.

De los 10 conglomerados se seleccionaron 10 cepas representantes en base al promedio de cada grupo formado de todas las variables y se seleccionó al más cercano.

Al conglomerado 2 se le atribuye el mayor número de cepas con 38.

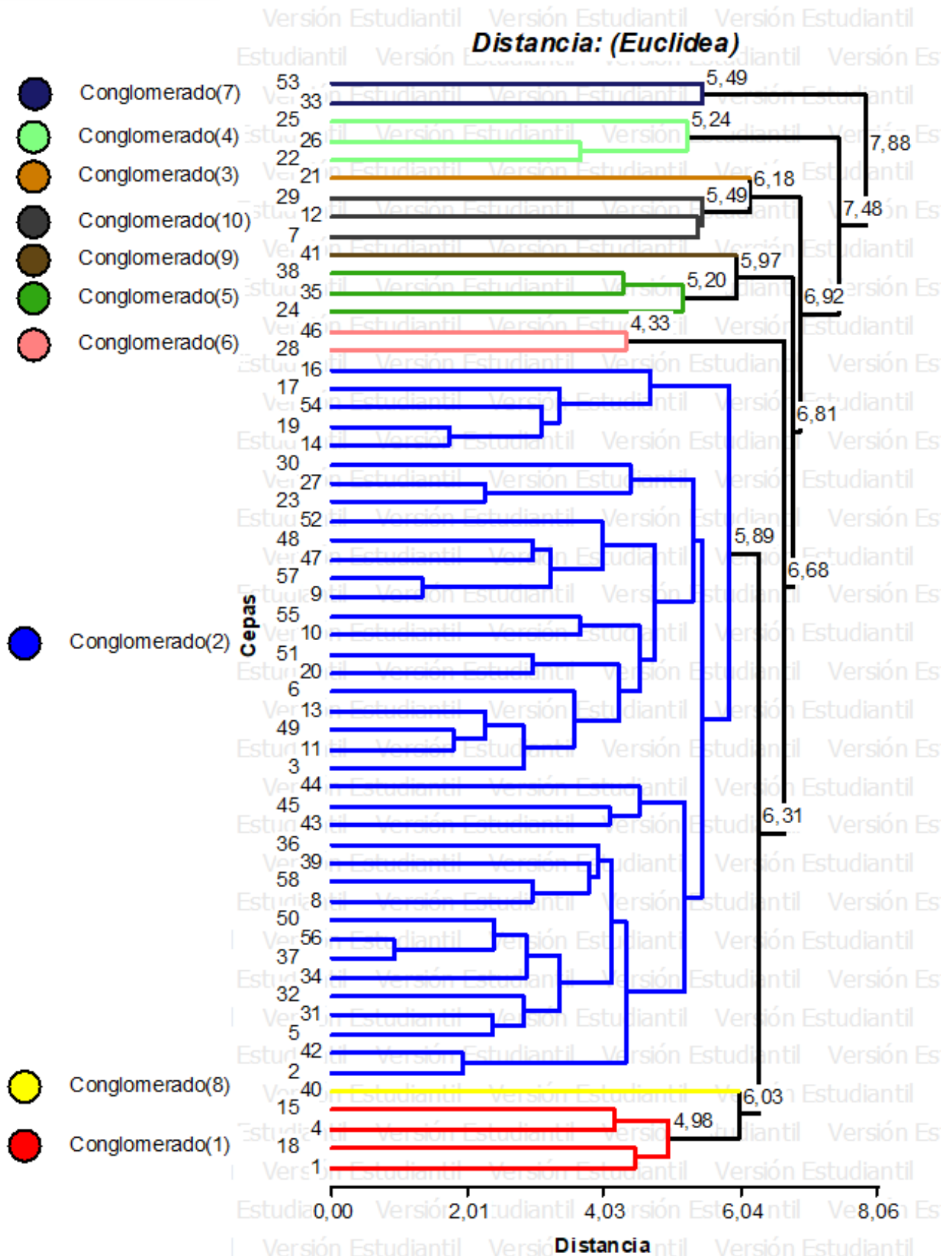


Figura 11. Dendrograma de las cepas de Beauveria spp.



## 5.6. Evaluación de la capacidad biopesticida

### 5.6.1 Porcentaje de Mortalidad

Se analizaron los datos levantados cada cinco días para los quince días que duró el experimento. Los datos no presentaron normalidad, por lo tanto, se aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. Para el día cinco el análisis no paramétrico presentó diferencias estadísticamente significativas para el número de adultos muertos de *Hypothenemus hampei* y las distintas cepas ( $P < 0.05$ ), siendo la cepa 41 la que mostró el mayor número de insectos muertos; entre tanto la cepa 40 tuvo el menor número de adultos muertos con respecto al control (Tabla 4).

**Tabla 4.** Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 5 días post-inoculación.

Tratamiento	Medias	Rangos	Niveles
Control	0.33	2.00	A
C40	2.33	5.67	A B
C24	3.33	9.17	A B C
C29	3.33	9.17	A B C
C28	5.00	15.50	A B C D
C25	5.67	19.50	B C D
C6	6.33	23.17	C D
C53	6.33	23.50	C D
C1	6.67	24.83	D
C21	6.67	25.33	D
C41	7.33	29.17	D

**Nota:** Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Dentro del día 10 la prueba de Kruskal Wallis presentó diferencias estadísticamente significativas para el número de adultos muertos de *Hypothenemus hampei* y las distintas cepas ( $P < 0.05$ ). Las cepas 41 y 53 presentaron el mayor número de insectos muertos con respecto al control; mientras que las cepas 24 y 29 presentaron el menor número de adultos muertos tras el paso de 10 días con respecto al control (Tabla 5).

**Tabla 5.** Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 10 días post-inoculación.

Tratamientos	Medias	Rangos	Niveles
Control	2.00	2.00	A
C24	5.67	6.17	A B
C29	6.67	8.33	A B
C28	7.33	11.00	A B C
C40	8.00	14.00	A B C D
C25	9.00	20.00	B C D
C21	9.33	21.50	B C D
C1	9.67	24.50	C D
C6	9.67	24.50	C D
C41	10.00	27.50	D
C53	10.00	27.50	D

**Nota:** Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

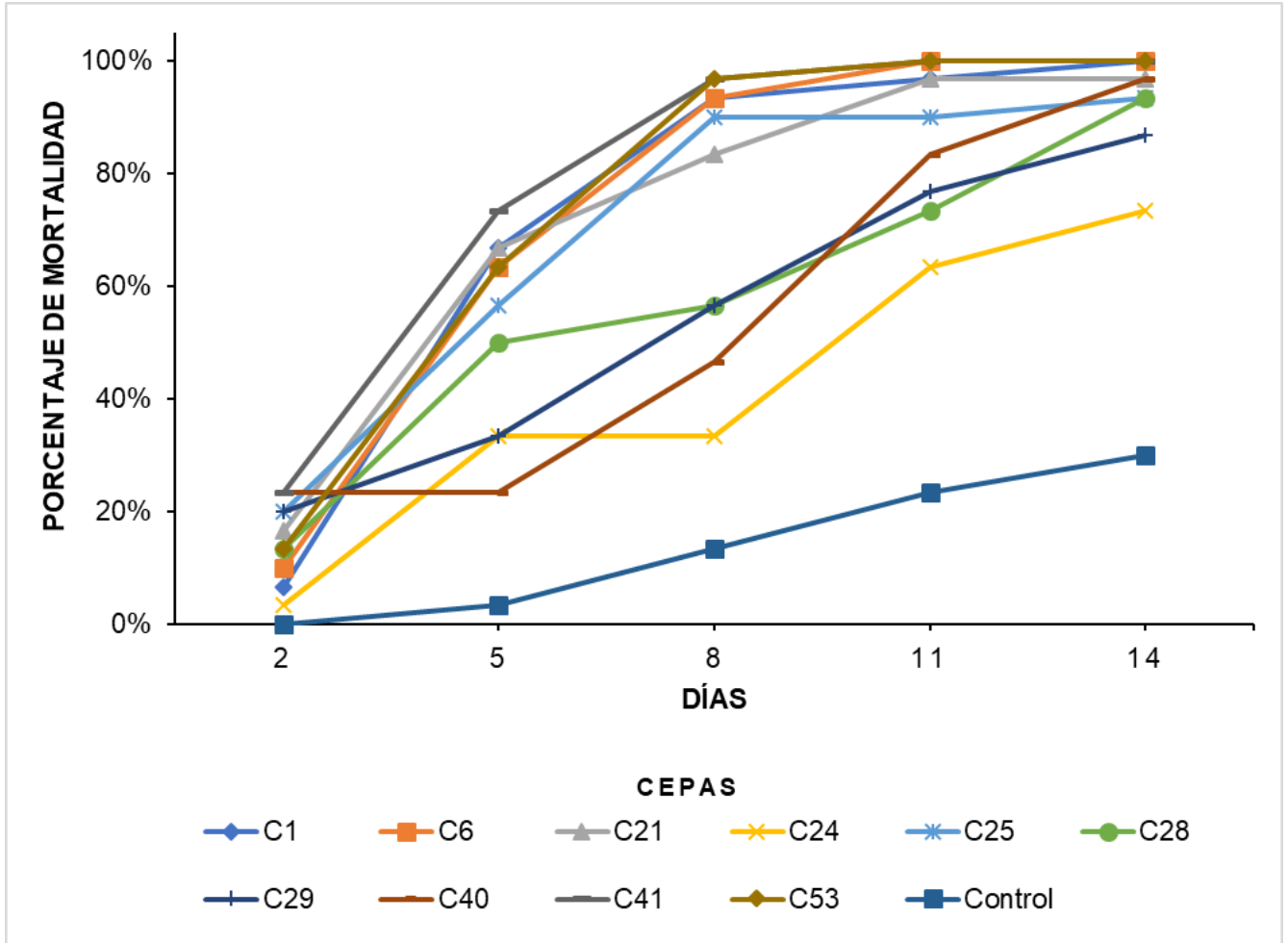
Al realizar el análisis de los datos del número de insectos muertos post-inoculación con las diferentes cepas aisladas de *Beauveria* spp. a los 15 días, la prueba de Kruskal Wallis ( $P < 0.05$ ) mostró diferencias estadísticamente significativas para las cepas 1, 6, 41 y 53 con el mayor número de insectos muertos, en tanto que la cepa 24 presentó el menor número de adultos muertos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal Wallis para el número de insectos muertos tras el paso de 15 días.

Tratamientos	Medias	Rangos	Niveles
Control	3.00	2.00	A
C24	7.33	5.17	A
C29	8.67	9.83	A B
C25	9.33	15.83	A B C
C28	9.33	15.83	A B C
C21	9.67	20.17	A B C
C40	9.67	20.17	B C
C41	10.00	24.50	C
C1	10.00	24.50	C
C53	10.00	24.50	C
C6	10.00	24.50	C

**Nota:** Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

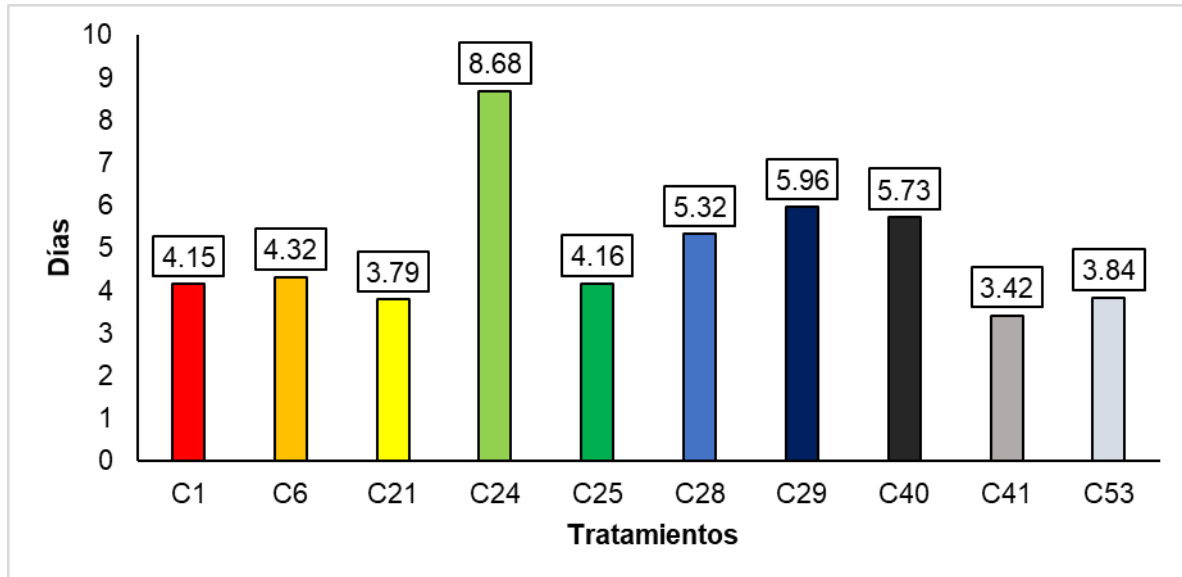
De manera general las cepas 1, 6, 41 y 53 presentaron mayores porcentajes de mortalidad a lo largo del experimento con relación al control, también podemos recalcar que las dos últimas llegaron al 100% de mortalidad al cabo de 10 días en comparación de las cepas 1 y 6 que lo hicieron en 13 días (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de mortalidad de las cepas analizadas en el bioensayo.

### 5.6.2 Tiempo Letal Medio (TL50)

Para determinar el tiempo letal medio se realizó el análisis probit, el mismo reveló que las cepas 21, 41 y 53 tuvieron el menor tiempo letal medio. La cepa C24 fue la que presentó el mayor tiempo letal medio (Figura 13).



**Figura 13.** Tiempo letal medio para las cepas analizadas en el bioensayo.

## Discusión

De las 20 fincas evaluadas en 7 no se encontró la presencia de *Beauveria* spp. debido a que este hongo se encuentra principalmente en zonas húmedas y en donde la incidencia de broca es alta (Vuelta *et al.*, 2017). Cabe mencionar que en aquellas fincas en donde no se encontró al hongo se estaba combatiendo a la plaga mediante control etológico.

Las características macroscópicas de los aislados de *Beauveria* spp. coinciden con los descritos por González *et al.* (2021), pues en su estudio obtuvo colonias circulares de color blanco en el anverso y color amarillento en el reverso. De la misma forma, este autor observó los tres tipos de elevación desde plana a convexa, en tanto que la superficie de la mayor parte de las colonias no presentó irregularidades. El aspecto de los aislados en este estudio fue de algodonosa en su inicio hasta polvoriento.

Con relación a las características microscópicas, González *et al.* (2021) reporta resultados similares a los nuestros, ya que en su estudio el tamaño de las conidias de *Beauveria* spp. oscilaron entre 1.2-3.0 x 1.0-2.8  $\mu\text{m}$ , siendo este tamaño también reportado por diversos autores, quienes concluyeron que las cepas con conidias esféricas menores 3  $\mu\text{m}$  de diámetro pueden considerarse como *Beauveria bassiana* spp. (Kepler *et al.* 2017). Por otra parte, Rehner *et al.* (2011) da a conocer que las conidias de *Beauveria* spp. se caracterizan por ser hialinas, de paredes lisas de 1.5 a 5.5  $\mu\text{m}$  y de formas globosas a cilíndricas o vermiformes. Lo mismo menciona Humber (2012), quien indica que las conidias de *B. bassiana* tienen un diámetro  $\leq 3.5 \mu\text{m}$ , mientras que la conidia de *B. brongniartii* oscila entre 2.5 a 4.5  $\mu\text{m}$ .

Rehner *et al.* (2011) manifiestan que las fiálides son solitarias en grupos laterales densos, base subesférica a ampuliforme, su ápice con un raquis geniculado y denticulado indeterminado. Según las claves dicotómicas de De Hoog (1972) el largo de las fiálides de *B. bassiana* oscilan entre las 15  $\mu\text{m}$ , mientras que las de *B. brongniartii* rondan las 9  $\mu\text{m}$ . Estos datos concuerdan con los encontrados en este estudio.

La longitud de los conidióforos de *B. bassiana* miden 20  $\mu\text{m}$  o más por 1  $\mu\text{m}$  de ancho, los conidióforos de *B. brongniartii* miden hasta 25  $\mu\text{m}$  de largo por 1- 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y los de *B. alba* puede llegar a medir hasta 35  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho (De Hoog, 1972). Estos datos concuerdan con los datos reportados en el presente estudio.

Con relación a la capacidad biopesticida González *et al.* (2021) expone resultados similares a los nuestros, obteniendo un porcentaje de mortalidad superior al 70% en el 60% de los aislados al paso de 15 días después de la inoculación, siendo sus mejores tratamientos RS-lj006 y Bb1400 con un 100% de mortalidad en condiciones de laboratorio.

Bustillo (2020) demuestra que el ciclo de infección de *Beauveria bassiana* sobre *H. hampei* en condiciones de laboratorio en promedio dura 8,2 días. D, Torres *et al.* (2016) obtuvo un porcentaje de mortalidad del 100% después de 6 días de su experimento. Estos resultados no se asemejan a los alcanzados en la presente investigación, no obstante Vuelta *et al.* (2017) atribuye esta variación de tiempo a la humedad, ya que la mortalidad de *H. hampei* es de 9 días si las condiciones de humedad relativa son del 70 al 80%, debido a que la viabilidad de las esporas del hongo baja.

Por otra parte Godoy *et al.* (2007), mencionan en su estudio el porcentaje de germinación de esporas de cinco aislados de *Beauveria bassiana* en PDA fue superior al 60% a 25°C mientras que el porcentaje de germinación a 30°C oscilo entres el 28 y 37%, haciendo alusión a que la temperatura puede alterar al desarrollo del hongo durante su fase infectiva. Por otra parte, Blanco (2017) menciona que existe una pérdida gradual de la virulencia del hongo en los pases inoculativos.

Con respecto al tiempo letal al 50% (TL<sub>50</sub>), el estudio de González *et al.* (2021) concuerda con nuestros resultados, encontrando que las cepas más efectivas causaron el 50 % de mortalidad en un lapso de 3 días, mientras las cepas restantes tardaron hasta 11 días. Del mismo modo, Torres *et al.* (2016) obtuvo resultados similares a los nuestros encontrando la dosis letal media entre 2.9 días a 4.33 días. Finalmente, Fernández (2020) en su estudio menciona que tiempo letal al 50% (TL<sub>50</sub>) se estima en aproximadamente 6.3 días para adultos de *H. hampei*.

### Conclusiones

En base al presente trabajo de investigación podemos concluir que:

- 1) La parroquia de Cuchaentza es la más afectada por *Hypothenemus hampei*.
- 2) Cuchaentza es la parroquia presenta el mayor número de aislados de *Beauveria* spp.
- 3) Las características macro y microscópicas de las cepas aisladas en el presente estudio corresponden a *Beauveria* spp.
- 4) Las cepas de *Beauveria* spp. 1, 6, 41 y 53 presentaron mayor patogenicidad frente al control a nivel de laboratorio.

### Recomendaciones

Se sugiere que para futuros trabajos de investigación de laboratorio sean realizados por medio de pruebas de identificación moleculares, con el fin de determinar con exactitud la cantidad total de especies de *Beauveria* spp. con la que se cuenta para obtener un tamaño de muestra óptima de cepas resultantes.

De igual manera, se sugiere continuar con la investigación de capacidad biopesticida en campo para evaluar el desarrollo y la adaptabilidad de las cepas de *Beauveria* spp. en condiciones no controladas, permitiendo cuantificar los efectos y la tasa de mortalidad de la broca del café.

## Referencias

- Alejos, G., & Valverde, A. (2020). Comportamiento de la broca del café (*Hypothenemus Hampei*) ante efectos del biocida neem (*Azadirachta Indica*) e higuierilla (*Ricinus Communis*) en Monzón, Perú. *Revista Investigación Agraria*, 2(1), 64–71. <https://doi.org/10.47840/ReInA.2.1.837>
- Asociación de nacional de exportadores de café. (2021). *Exportaciones de café del Ecuador* [Archivo Pdf]. anecafé. <https://www.anecafe.org.ec/wp-content/uploads/2020-GRAFICO-3.pdf>
- Arcila, A., Bustillo, A., & Chaves, E. (2006). Estudio de la cepa Bb9205 de *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Revista Cenicafé*, 20
- Arias, E. (2018). *Ciclo biológico de la broca del café (Hypothenemus hampei (Ferrari 1867)), en condiciones de laboratorio en Tingo María*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria de la Selva]. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1396>
- Aspiazu, K., Navarro, J., & Mendoza, O. (2009). *Proyecto de comercialización del café de habas (café orgánico) actuando como intermediario para el consumo local en la ciudad de Guayaquil y como una opción de exportación*. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/7693>
- Assis, R., Pratisoli, D., Moreira, L., De Assis, J., Oliveira, J., Akemi, L., & Pacheco, A. (2020). Mortality of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* in Field, with Pre and Post Application of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Associated to Emulsifiers. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 7(5). Retrieved from <http://journal-repository.com/index.php/ijaers/article/view/1958>
- Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., Jaronski, S., & Viera, W. (2019). Manual para el análisis de calidad de formulaciones de hongos benéficos. *Manual N° 112*, 45.
- Bayman, P., Mariño, Y., García, N., Oduardo, O., & Rehner, S. (2021a). Local isolates of *Beauveria bassiana* for control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Puerto Rico: Virulence, efficacy and persistence. *Biological Control*, 155, 104533. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104533>
- Benavides, P., Góngora, C., & Bustillo, A. (2012). IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. In (Ed.), *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/28740>
- Blanco, C. (2017). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* en generaciones reproductivas. *Revista Apthapi*, 3(3), 639-651 [http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-03042017000300005&lng=es&nrm=iso](http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-03042017000300005&lng=es&nrm=iso)
- Bustillo, A. (1993). Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista colombiana de entomología*, 19, 123-130.



- Bustillo, A. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia, 30-53.
- Bustillo, A. (2002). Los hongos entomopatógenos en el control de insectos plagas. *Memorias Curso Internacional Teórico - Práctico. Sección I. Entomopatógenos de la broca del café*, Chinchiná, Colombia, 1 - 53.
- Bustillo, A. (2006). Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(2): 101-116.
- Bustillo, A. (2018). Parasitoids of african origen to control the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in Colombia, *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (pp. 520-528). Agrosavia.
- Bustillo, A. (2020). *Beauveria bassiana* to control the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in Colombia *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (pp. 346-348). Agrosavia.
- Bustillo, A., Bernal, M., Benavides, P., & Chaves, B. (1999). Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Florida Entomologist*, 491-498.
- Bustillo, A., & Marin, P. (2002). Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Hoja Técnica No. 40. Catie. *Revista Manejo Integrado de Plagas*.
- Cajape, J. (2020). Identificación de nemátodos fitoparásitos en el cultivo de Café en la zona Jipijapa [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/50250>
- Capek, A., & Fassatióvá, O. (1977). Some biochemical characteristics of species of the genus *Beauveria*. *Folia microbiologica*, 22(4), 308–310. <https://doi.org/10.1007/BF02877662>
- Cárdenas, A., Villalba, D., Bustillo, A., Montoya, E., & Góngora, C. (2007). Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé*, 58(4), 293-303.
- Castillo, C., Cañizalez, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. (2014). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo-Venezuela. *Revista academia*. XV. 275-281.
- Castrillo, L., & Wheeler, M. (2020). Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures.
- Castrillón, J., Sanz, J., & Ramos, P. (2017). Algoritmo para la identificación de café lavado afectado por la broca del café. *Revista Cenicafé*, (pp. 7-19). [https://www.researchgate.net/publication/330524704\\_Algoritmo\\_Para\\_la\\_identificacion\\_de\\_Cafe\\_Lavado\\_Afectado\\_por\\_la\\_Broca\\_del\\_Cafe](https://www.researchgate.net/publication/330524704_Algoritmo_Para_la_identificacion_de_Cafe_Lavado_Afectado_por_la_Broca_del_Cafe)
- Damon, A. (2000). A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research* 90, 453–465 DOI:10.1017/S0007485300000584

- De Hoog, G. (1972). The Genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. Nov. *Mycologia*, 1. <https://doi.org/10.2307/3758542>
- ESPAC. (2020). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Instituto Nacional de Estadística y Censos *INEC*. Recuperado de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>
- Fernández, J. (2020). *Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana Sobre la broca del café (Hypothenemus hampei)*. Cuenca, Ecuador. [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19620>
- Fernández, S., & Cordero, J. (2005). Evaluación de atrayentes alcohólicos en trampas artesanales para el monitoreo y control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Bioagro*, 17 (3). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612005000300003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612005000300003)
- Figuroa, E., Pérez, F., & Godínez, L. (2015). *La producción y el consumo del café*. ECORFAN- Spain. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/64936>
- Fischersworing, B., & RoBkamp, R. (2001). *Guía para la caficultura ecológica*. Popayan, Colombia: Fischersworing, Beatriz
- Gasmi, L., Baek, S., Kim, J. C., Kim, S., Lee, M. R., Park, S. E., Shin, T. Y., Lee, S. J., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2021). Gene diversity explains variation in biological features of insect killing fungus, *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 11(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78910-1>
- Godoy, J. C., Valera, R. E., Guédez, C., Cañizalez, L. M., & Castillo, C. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 24(3), 415-425.
- González, C., Alvarado, R., & Zepeda, I. (2015). Distribución natural del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. En suelos agrícolas y no cultivados de la ciénega en Michoacán. *Entomología Mexicana*, 2(1), 253-259.
- González, G. I., Monzón, A., Santamaría Guerra, J., Santo, U., Caballero, S., Castrejon, K., & Sanjur, M. (2021). Caracterización morfofisiológica y molecular de hongos entomopatógenos asociados a *Hypothenemus hampei* en áreas cafetaleras de la comarca Ngäbe-Buglé. *La Calera*, 21(36). <https://doi.org/10.5377/calera.v21i36.11555>
- Guilcapi, M. (2018). Análisis del estado actual de la cadena de café y cacao [Archivo Pdf] Recuperado de [https://procurement-notices.undp.org/view\\_file.cfm?doc\\_id=186105](https://procurement-notices.undp.org/view_file.cfm?doc_id=186105)
- Haro, J. (2013). Un hongo mortal contra el picudo rojo. *EL PAÍS*. [https://elpais.com/ccaa/2013/02/15/valencia/1360950552\\_191881.html](https://elpais.com/ccaa/2013/02/15/valencia/1360950552_191881.html)
- Humber, R. (2005). Entomopathogenic Fungal Identification. Permanent microscopic mounts. *Mycologia* 64: 666-669
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. 151-187 DOI:10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3.

- Husseini, M. (2019). Effect of the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, on the beetarmyworm, *Spodoptera exigua* (Humbner) larvae (Lepidoptera: Noctuidae), under laboratory and open field conditions. *Egypt J Biol Pest Control*, 29(52).  
<https://doi.org/10.1186/s41938-019-0158-0>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA. (2019). *Manual de la producción sostenible de café en la República Dominicana*.  
<https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/8726/BVE20037756e.pdf?sequence=1>
- INIAP. (2003). *Mejora Genética del Café Árabe: Experiencias en Ecuador*. Quito-Ecuador
- Jaramillo, J. (2019). *Identificación de los insectos controladores de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari en la parroquia vilcabamba y los cantones olmedo, chaguarpamba, puyango y quilanga, de la provincia de Loja*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Loja].  
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22473/1/Junior%20Alejandro%20Jaramillo%20Cabrera.pdf>
- Jones, R. (1994). Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference, Weeds. Vol. 3. Brighton, RU., 1275-1282.
- Kepler, R. M., Luangsa-ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G.-H., Rehner, S. A., Aime, M. C., Henkel, T. W., Sanjuan, T., Zare, R., Chen, M., Li, Z., Rossman, A. Y., Spatafora, J. W., & Shrestha, B. (2017). A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus*, 8(2).  
<https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
- Leiva, S., Olivia, M., Rubio, K., Maicelo, J., & Milla, M. (2019). Uso de trampas de colores y atrayentes alcohólicos para la captura de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en plantaciones de café altamente infestadas. *Revista Colombiana de Entomología*, 45 (2).
- Lezaun, J. (2016). Broca del Café, el enemigo principal de los cafetales. Recuperado de <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/broca-del-cafe>
- Loyola, G., & Rodríguez, A. (2020). Comportamiento de la broca del café (*Hypothenemus Hampei*) ante efectos del biocida Neem (*Azadirachta Indica*) e Higuera (*Ricinus Communis*) en Monzón, Perú. *Revista Investigación Agraria*, 2(1).
- MAATE. (2022). AUTORIZACIÓN DE RECOLECCIÓN DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 2363.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2020). *Morona Santiago comercializa más de 440 quintales de café de calidad*. Recuperado de <https://www.agricultura.gob.ec/morona-santiago-comercializa-mas-de-440-quintales-de-cafe-de-calidad/>
- Marrero, I., Hernández, A., & Castellanos, L. (2011). *Control Biológico de *Hypothenemus hampei* Ferrari con una cepa nativa de *Beauveria bassiana* Bals Vuill en el Escambray Cienfuegos*. [Tesis de Maestría, Universidad de Cienfuegos Carlos Rafael Rodríguez].  
[https://www.researchgate.net/publication/322909182\\_Control\\_Biologico\\_de\\_Hypothenemus\\_hampeii\\_Ferrari\\_con\\_una\\_cepa\\_nativa\\_de\\_Beauveria\\_bassiana\\_Bals\\_Vuill\\_en\\_el\\_Escambray\\_Cienfuegos](https://www.researchgate.net/publication/322909182_Control_Biologico_de_Hypothenemus_hampeii_Ferrari_con_una_cepa_nativa_de_Beauveria_bassiana_Bals_Vuill_en_el_Escambray_Cienfuegos)

- Mendoza, G., Guzmán, O., & Salinas, A. (2021). Manejo de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), con atrayentes etanólicos en cultivos de café de Coatepec, Veracruz, México. *Revista Chilena de Entomología*, 47 (2): 265-273.
- Miranda, G., & Silva, V. (2019). *Elaboración de paneles decorativos a partir de la melaza de caña, cáscara de café, tierra, paja y agua para interior de viviendas*. [Tesis de Grado, Universidad Laica Vicente Rocafuerte de Guayaquil]  
<http://repositorio.ulvr.edu.ec/bitstream/44000/3459/1/T-ULVR-3039.pdf>
- Montoya, E. (1999). Caracterización de la infestación del café por la broca y efecto del daño en la calidad de la bebida. *Revista Cenicafé*, 50 (4), 245-258.
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Água- An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 6 (2). 77-90.
- Murphy, S. T. (1990). Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera. Scolytidae): Previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and Information*, 11, 107-117
- Nicholls, C. (2008). *Control biológico de insectos: Un enfoque agroecológico*. Universidad de Antioquia, pp: 120-126.
- 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*. [Tesis de Grado, Universidad Politécnica Salesiana].  
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9400>
- Piato, K., Lefort, F., Subía, C., & Rochefort, S. (2018). The evaluation of agroforestry systems in Robusta coffee plantations in the Amazonian Ecuadorian Region with respect to pests and diseases. Orellana, Ecuador.  
<https://doi.org/10.13140/rg.2.2.11542.70727/1>
- Piccoli, L., Bojhanich, M. V., López, M. de los A., & Sosa, M. de los A. (2010). Guía de trabajos prácticos Microbiología General. Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, 1-57.
- Pico, J., Caicedo, C., Suárez, C., Paredes, N., Subia, C., & Fernández, F. (2018). Manejo Integrado de los Principales Problemas Fitosanitarios en el Cultivo de Café (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner) Bajo Diferentes Niveles de Sombra. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1er Congreso internacional alternativas tecnológicas para la producción agropecuaria sostenible en la Amazonía ecuatoriana*.  
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5402>
- Posada, F., & Bustillo, A. (1994). El hongo *Beauveria bassiana* y su impacto en la caficultura Colombiana. *Agricultura Tropical (Colombia)*, 31 (3), 97-106.
- Posada, F., & Vega, F. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycoscience*, 47 (5), 284–289. doi:10.1007/s10267-006-0308-6

- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31 (12), 856-860. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es).
- Qu, S., & Wang, S. (2018). Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, 83, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.010>
- Rehner, S., Minnis, A., Sung, G.-H., Luangsa-Ard, J., & Devotto, L. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103, 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rice, R. (2003). Coffee production in a time of crisis: Social and environmental connections. *SAIS Review*, 23 (1), 221-245.
- Rivera, M., & Diaz, H. (2020). *Efectividad de manejo convencional y ecológico de la broca del café (Hypothenemus hampei)*. [Tesis de Grado, Universidad Científica del Sur]. <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/1680>
- Rodríguez, G. (2009). *Evaluación de Factores de la Competitividad del Café Ecuatoriano en el Mercado Mundial*. [Tesis de Grado, Universidad de Especialidades Espíritu Santo]. <http://repositorio.uees.edu.ec/123456789/982>
- Siahaan, T., Supriana, T., & Iskandarini. (2021). Analysis of effect of production factors on the production and income of coffee farmers using *Beauveria bassiana* in Siborongborong Subdistrict. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 782(2), 022058. doi:10.1088/1755-1315/782/2/022058
- Sponagel, K. (1994). La broca del café *Hypothenemus hampei* en plantaciones de café robusta en la Amazonía Ecuatoriana. *Wissenschaftlicher Fachverlag*. 185 p.
- Torres, J. del C., Torres de la Cruz, M., Pérez, M., de la Cruz, A., Ortiz, C., & García, S. (2016). Characterization of native isolates of *Beauveria bassiana* and its pathogenicity to *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, Mexico. *Revista Colombiana de Entomología*, 42, 28-35.
- Valverde, Y., Moreno, J., Quijije, K., Castro, A., Merchán, W., & Gabriel, J. (2020). Los bioestimulantes: Una innovación en la agricultura para el cultivo del café (*Coffea arabica* L). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 11 (1), 18-28.
- Vélez, P., Estrada, M., González, M., Valderrama, A., & Bustillo, A. (2001). Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, No. 62 p. 3 8-5 3.
- Vuelta, D. R., Rizo, M., & Basile, R. (2017). Evaluación del efecto del hongo *Beauveria bassiana*, trampas y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en las yaguas. *Ciencia en su PC*, 4, 38-52.
- Wegbe, K., Decazy, B., Alauzet, C., & Dufour, B. (2003). Estimation of Production Losses Caused by the Coffee Berry Borer Coleoptera: Scolytidae) and Calculation of an Economic Damage Threshold in Togolese Coffee Plots. *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1473-1478. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.5.1473>

Wraight, S., Galaini, S., Howes, R., Castrillo, L., Griggs, M., Carruthers, R., & Keith, L. (2021). Efficacy of *Beauveria bassiana* strain GHA spray applications against coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island. *Biological Control*, Volume 161, 104587. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104587>.

## Anexos

### Anexo A. Evaluación de la infestación de broca dentro de las fincas



### Anexo B. Recolección de cerezas brocadas con presencia de *Beauveria* spp.



## Anexo C. Preparación de medio PDA



## Anexo D. Siembra del insecto infectado con el hongo en medio PDA





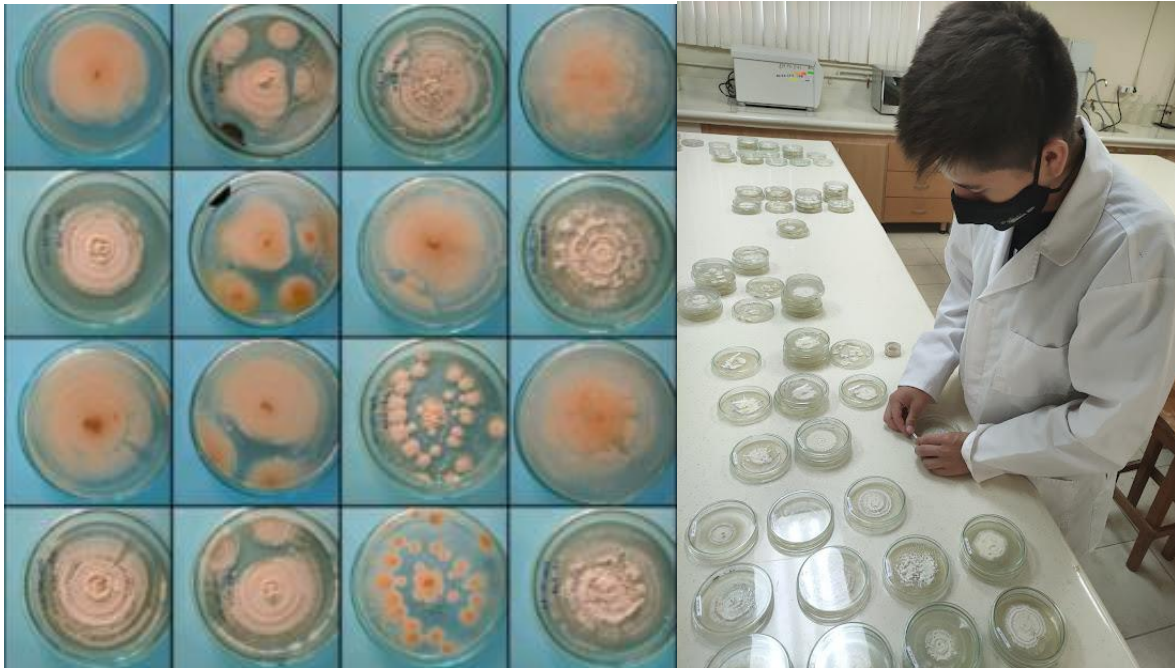
## Anexo E. Siembra del hongo para realizar cultivo monospórico



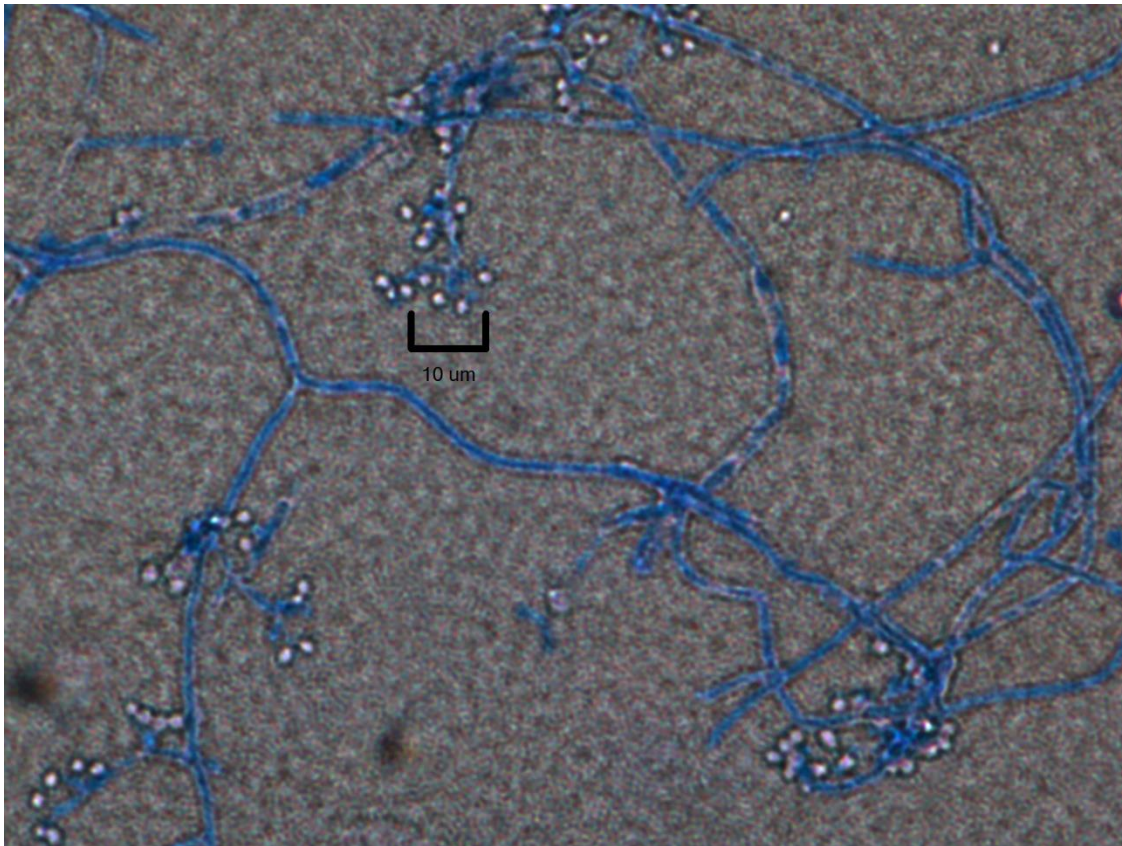
## Anexo F. Evaluación de la germinación de esporas para cultivo monospórico



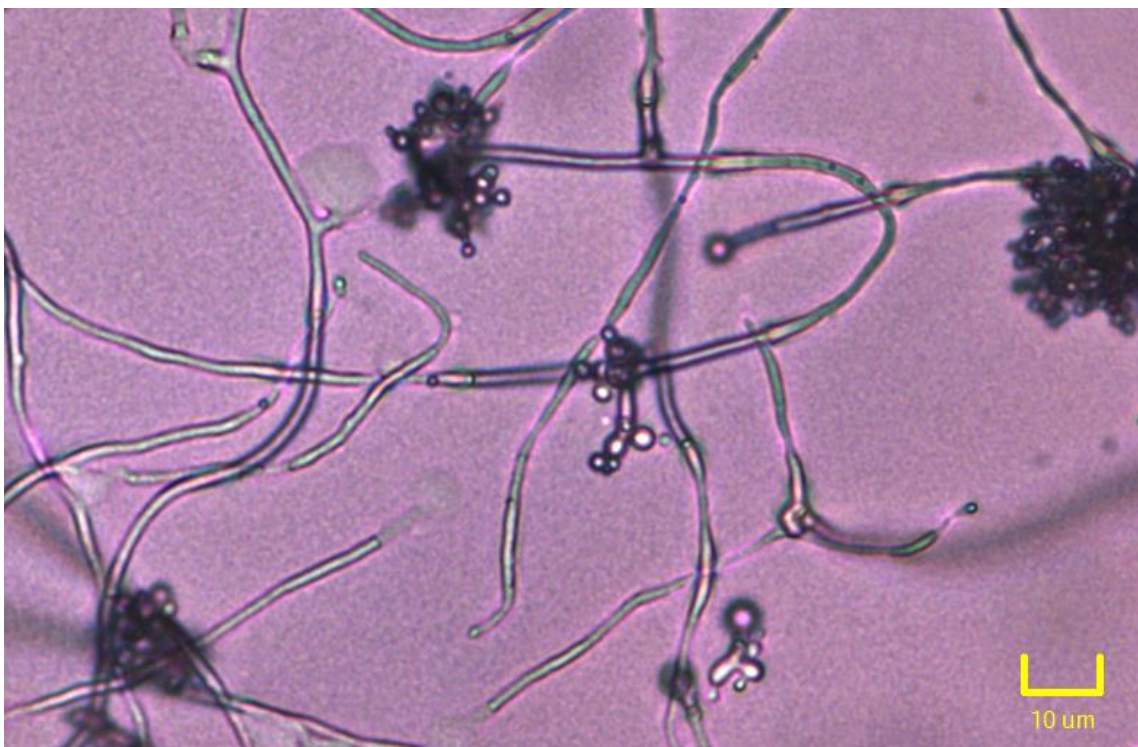
**Anexo G.** Caracterización macroscópica con guía en la “Imagen 1”



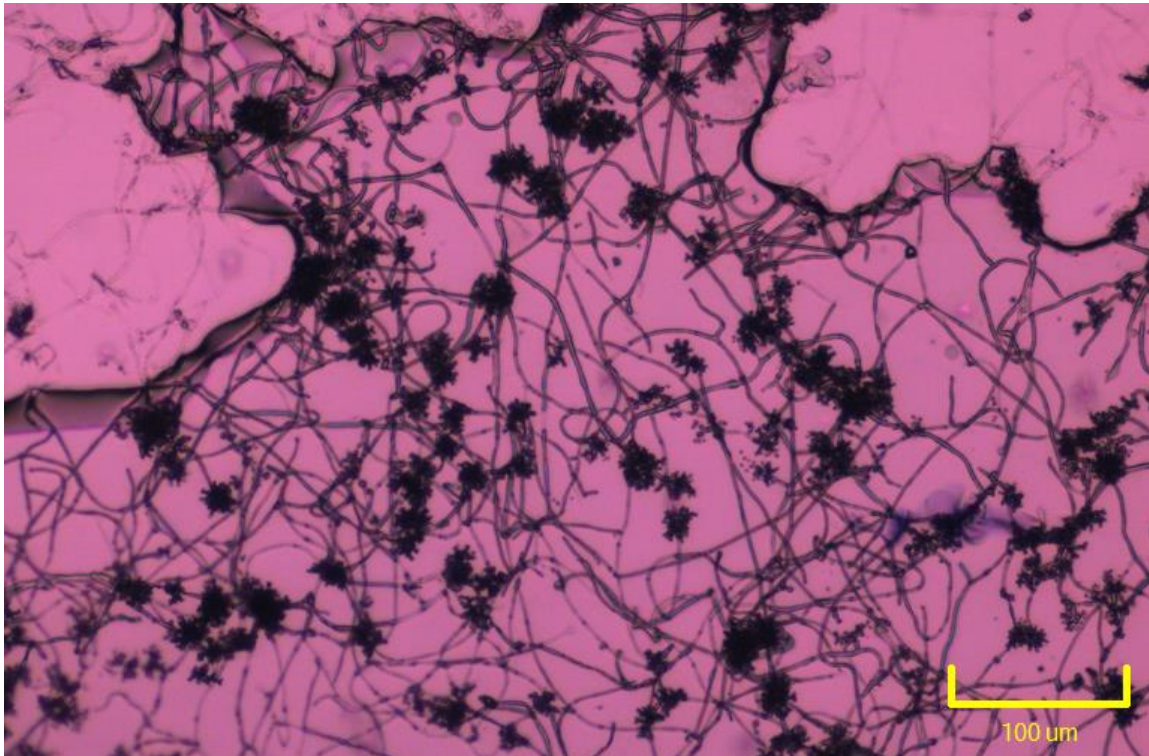
**Anexo H.** Caracterización microscópica de las conidias con guía en la “Imagen 2”



**Anexo I.** Caracterización microscópica de las fiálides con guía en la “Imagen 2”



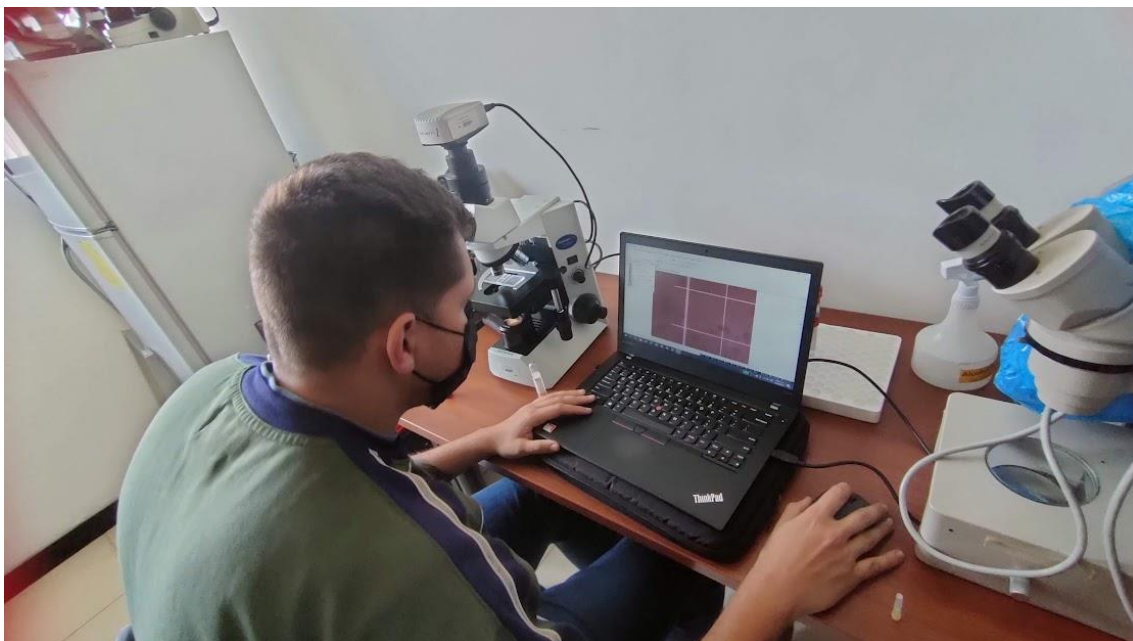
**Anexo J.** Caracterización microscópica de los conidióforos con guía en la “Imagen 2”



**Anexo K.** Cría del insecto *Hypothenemus hampei*



**Anexo L.** Determinación de la concentración de conidias



## Anexo M. Evaluación de la capacidad biopesticida



## Anexo N. Adultos de *H. hampei* infectados con *Beauveria* spp.



**Anexo O.** Tamaños de las distintas estructuras microscópicas del hongo

<b>Cepa</b>	<b>Promedio conidias µm</b>	<b>Promedio Conidióforos µm</b>	<b>Promedio Fiálides µm</b>
C1	2.34	24.62	5.50
C2	1.72	20.61	6.21
C3	1.18	17.39	5.67
C4	1.35	19.28	9.31
C5	1.75	22.91	8.16
C6	2.18	13.05	8.32
C7	2.26	20.53	8.54
C8	1.46	19.98	7.41
C9	1.17	22.40	8.42
C10	1.23	18.36	9.42
C11	1.94	20.43	8.79
C12	1.57	21.59	9.16
C13	1.88	21.44	7.42
C14	1.39	24.25	5.48
C15	1.62	20.58	8.60
C16	1.97	18.08	9.05
C17	1.08	26.38	5.94
C18	1.23	19.17	4.98
C19	1.27	20.79	8.50
C20	1.61	26.26	5.66
C21	2.21	35.23	10.23
C22	1.96	22.13	6.66
C23	2.18	16.83	14.65
C24	1.41	18.08	6.49
C25	1.67	23.96	12.55
C26	1.65	23.90	6.53
C27	2.05	21.01	14.42
C28	1.30	29.81	11.52
C29	1.20	23.95	11.30
C30	1.99	22.73	10.68
C31	1.63	19.88	7.42
C32	2.00	24.10	8.63
C33	1.37	27.48	6.51
C34	2.38	23.81	7.22
C35	1.31	17.25	8.22
C36	1.07	21.94	9.81
C37	1.60	23.83	7.28
C38	1.40	21.96	10.01
C39	2.00	18.12	8.69
C40	1.52	26.94	7.78
C41	1.21	33.01	8.95
C42	1.43	13.36	5.98
C43	2.01	18.89	8.42
C44	2.40	18.47	6.55
C45	1.41	21.62	7.78

C46                      1.87                                      25.43                                      10.02





**Continuación.** Tamaños de las distintas estructuras microscópicas del hongo





<b>Cepa</b>	<b>Promedio conidias µm</b>	<b>Promedio Conidióforos µm</b>	<b>Promedio Fiálides µm</b>
C47	1.60	21.30	7.35
C48	2.33	19.46	8.26
C49	1.72	22.24	5.41
C50	1.53	28.21	8.40
C51	1.75	27.19	6.48
C52	1.33	17.37	5.52
C53	1.85	24.30	7.33
C54	1.63	23.57	7.01
C55	2.04	19.65	8.77
C56	1.74	27.34	7.56
C57	1.62	23.48	7.56
C58	1.63	22.37	8.36








## Anexo P. Características macroscópicas del hongo





Cepa	Forma	Elevación	Textura del micelio	Color anverso	Color reverso	Superficie	Sinnemas	Foto anverso	Foto Reverso
C1	circular	elevada y limitada	algodonosa	blanco	amarillo-rojizo	plegada	no		
C2	circular	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	blanco	sectorizada	si		


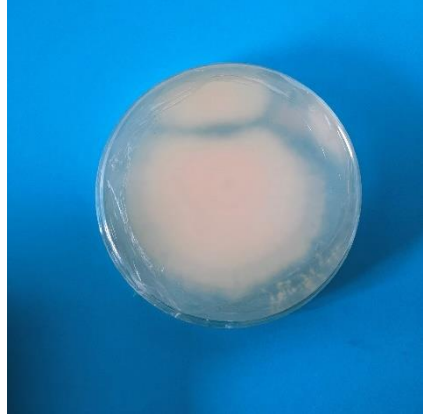

C3	circular	plana y extendida	polvorienta	blanco	amarillo	plegada	no		
C4	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	amarillo-rojizo	plegada	si		

C5	circular	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	amarillo	sectorizada	si		
C6	irregular	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		


C7	irregular	plana y extendida	aterciopelada	blanco	rojo	con surcos radiales	no		
C8	circular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	blanco	sectorizada	si		

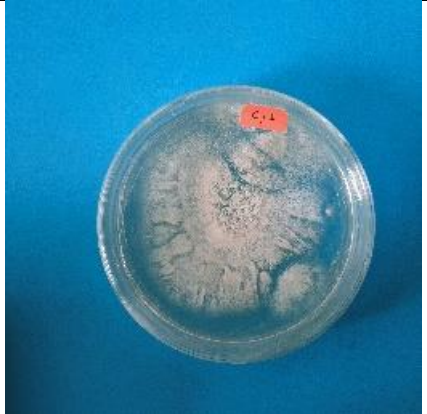


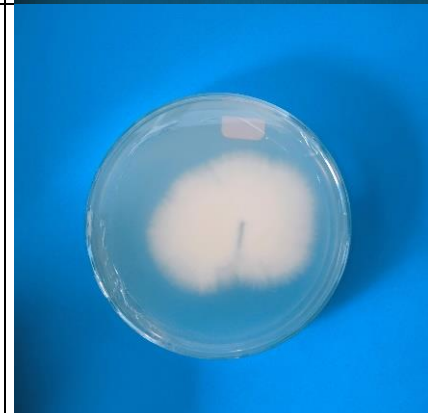
C9	irregular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	amarillo	plegada	no		
C10	irregular	plana y extendida	aterciopelada	blanco	blanco	con surcos radiales	no		




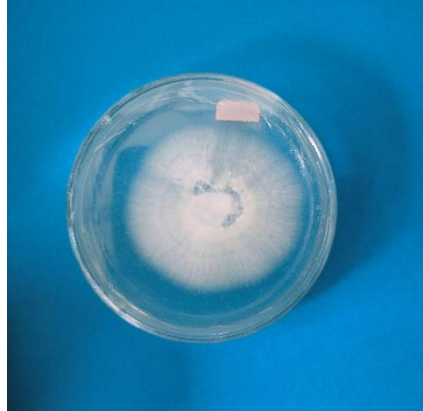
C11	circular	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		
C12	circular	convexa umbilicada	polvorienta	blanco	rojo	plegada	si		

C13	circular	plana y extendida	polvorienta	blanco	amarillo	plegada	no		
C14	filamentosa	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	con surcos radiales	no		







C15	irregular	plana y extendida	algodonosa	blanco	amarillo-rojizo	sectorizada	no		
C16	filamentosa	plana y extendida	aterciopelada	blanco	amarillo	plegada	no		





C17	filamentosa	plana y extendida	aterciopelada	blanco	blanco	con surcos radiales	no		
C18	irregular	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	amarillo-rojizo	plegada	no		





C19	filamentosa	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	con surcos radiales	no		
C20	circular	plana y extendida	polvorienta	blanco	amarillo	sectorizada	no		

C21	circular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	rojo	sectorizada	no		
C22	irregular	plana y extendida	polvorienta	amarillo	marron	plegada	no		

C23	irregular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		
C24	irregular	plana y extendida	polvorienta	blanco	amarillo-marron	plegada	no		

C25	irregular	convexa umbilicada	polvorienta	amarillo	marron	sectorizada	no		
C26	irregular	plana y extendida	polvorienta	blanco	marron	plegada	no		


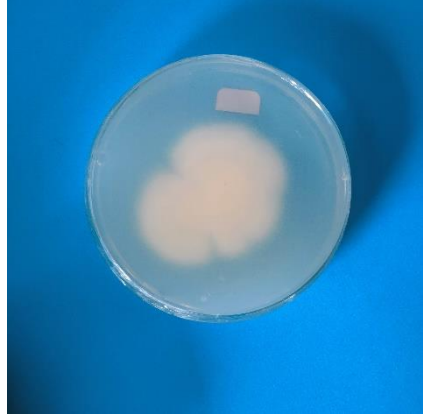


C27	circular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		
C28	rizoidal	plana y extendida	algodonosa	amarillo	amarillo	con surcos radiales	no		

C29	filamentosa	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	rojo	con surcos radiales	no		
C30	irregular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	blanco	sectorizada	si		







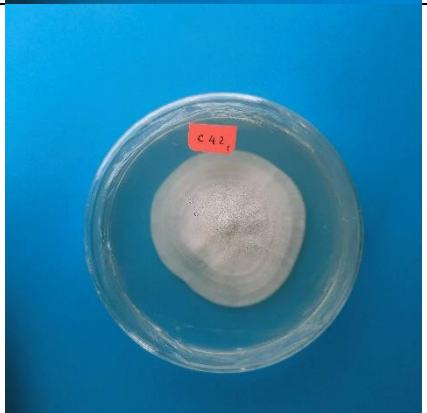
C31	circular	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	amarillo	sectorizada	si		
C32	circular	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	amarillo	con surcos radiales	si		



C33	circular	convexa umbilicada	polvorienta	blanco	blanco-amarillo	sectorizada	si		
C34	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	amarillo	sectorizada	si		





C35	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	amarillo-marron	sectorizada	si		
C36	circular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	amarillo	sectorizada	no		

C37	irregular	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	amarillo	sectorizada	si		
C38	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	amarillo	amarillo-marron	con surcos radiales	si		

C39	circular	convexa umbilicada	polvorienta	blanco	blanco	sectorizada	no		
C40	rizoidal	convexa umbilicada	polvorienta	blanco	amarillo-rojizo	sectorizada	si		


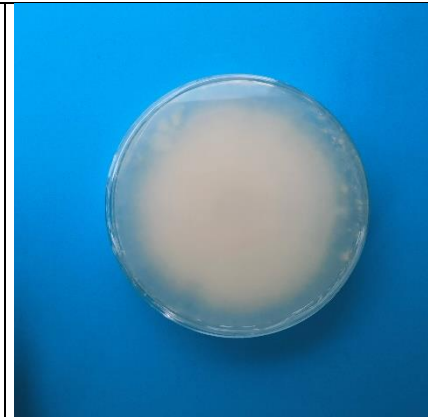
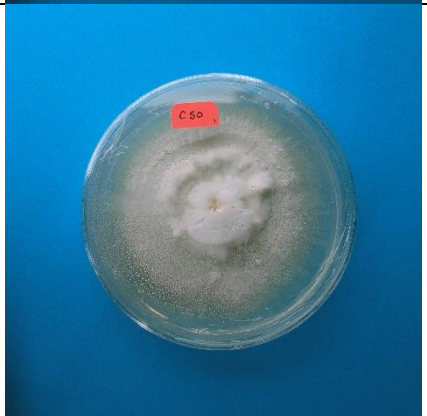
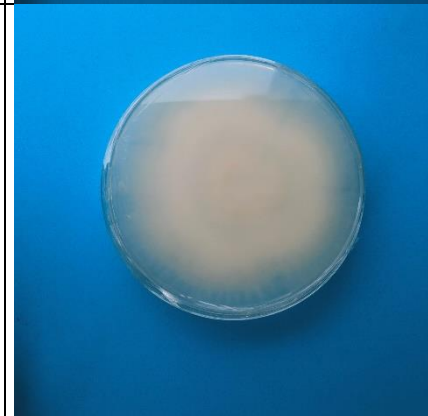
C41	irregular	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	amarillo-marron	sectorizada	no		
C42	circular	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	blanco	sectorizada	si		




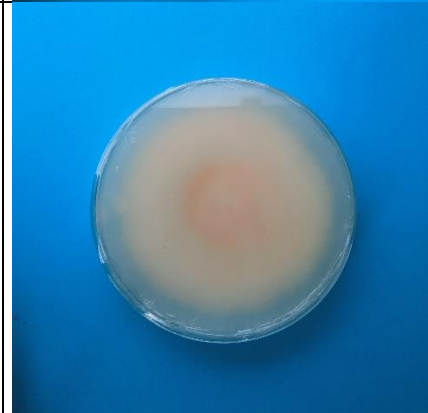
C43	rizoidal	elevada y limitada	aterciopelada	blanco	amarillo	con surcos radiales	si		
C44	rizoidal	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	blanco	sectorizada	si		





C45	rizoidal	convexa umbilicada	polvorienta	blanco	amarillo	con surcos radiales	si		
C46	irregular	plana y extendida	algodonosa	amarillo	amarillo	con surcos radiales	no		






C47	circular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		
C48	circular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	amarillo	plegada	no		

C49	circular	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	plegada	no		
C50	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	amarillo	sectorizada	si		

C51	irregular	plana y extendida	polvorienta	blanco	blanco	sectorizada	no		
C52	circular	elevada y limitada	algodonosa	blanco	amarillo	plegada	si		

C53	rizoidal	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	blanco-amarillo	con surcos radiales	no		
C54	filamentosa	plana y extendida	algodonosa	blanco	blanco	sectorizada	no		

C55	circular	plana y extendida	aterciopelada	blanco	blanco	plegada	no		
C56	irregular	convexa umbilicada	aterciopelada	blanco	amarillo	sectorizada	si		

C57	irregular	elevada y limitada	polvorienta	blanco	amarillo	plegada	no		
C58	irregular	convexa umbilicada	algodonosa	blanco	blanco	con surcos radiales	si	