

**CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS”**

Realizado por:

DARLING SALOMEE MORENO ESPINOZA

Director del proyecto:

Ing. Alberto Aguirre, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 17 de Enero de 2022

**CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS**

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, DARLING SALOMEE MORENO ESPINOZA, con cédula de identidad # 180374238-4, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Moreno Salomee', with a horizontal line drawn through it.

180374238-4

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS”

Realizado por:

DARLING SALMEE MORENO ESPINOZA

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'A. Aguirre', is shown within a rectangular box.

FIRMA

**CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

LINO ARISQUETA Ph.D.

SUSANA CHAMORRO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 17 de Enero de 2022

**CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS**

DEDICATORIA

A mis padres.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

AGRADECIMIENTO

A mis padres y a mis ayudantes de laboratorio.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

17/01/2022 13:25:06

Para someter a:

To be submitted:

Control biológico in vitro de *Hypothenemus hampei* utilizando hongos entomopatógenos
nativos.

Salomee Moreno Espinoza¹, Alberto Alejandro Aguirre^{1*}

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas, Quito,
Ecuador. 17/01/2022 13:25:06

* AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ing. Alberto Alejandro Aguirre Ph.D., Universidad
Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-; email: alberto.aguirre@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: Control biológico

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Índice de contenidos

Introducción	6
Materiales y Métodos	9
Área de estudio	9
Fase de campo	10
Recolección de especímenes de <i>Hypothenemus hampei</i>	10
Colocación de trampas	10
Fase de laboratorio.....	10
Preparación de trampas	10
Aislamiento de los hongos	11
Selección y purificación de colonias fúngicas	11
Caracterización morfológica de los hongos aislados	13
Bioensayos	14
Análisis estadísticos.....	15
Resultados	15
Aislamiento de hongos entomopatógenos	15
Determinación de la eficiencia de letalidad de los hongos seleccionados.....	16
Discusión de resultados	18
Conclusiones	21
Recomendaciones.....	22
Bibliografía.....	22

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Anexos.....	27
-------------	----

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Resumen

El café es uno de los productos más cotizados a nivel mundial y Ecuador es uno de los países reconocidos por la calidad de café de exportación. Se conoce que muchos de los cultivos pueden llegar a tener problemas por insectos plaga que llegan a dañar diferentes partes de la planta. En este caso los cultivos de café no son la excepción debido a que es atacado principalmente por la broca del café (*Hypothenemus hampei*), afectando específicamente la calidad de las bayas. El uso de hongos entomopatógenos como control biológico de la broca del café es una de las estrategias utilizada para evitar los daños anuales que se dan por este insecto. Estos hongos presentan una actividad biopesticida que al ser utilizados en diferentes dosis pueden llegar a matar los insectos plaga de interés. Es por ello que en este estudio se ha planteado como objetivo general evaluar el efecto in vitro de la aplicación de hongos entomopatógenos sobre la plaga *Hypothenemus hampei*. Para esto se aislaron hongos del noroccidente de Pichincha, utilizando trampas de arroz e insectos, para posteriormente obtener cultivos axénicos y dosificarlos sobre los ejemplares de *Hypothenemus hampei* en un periodo de tiempo establecido. En los resultados se observa la muerte de los insectos; sin embargo, ésta estuvo relacionada al ciclo de vida de los mismos y no al efecto de los hongos aplicados, principalmente porque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento control (aplicación de agua estéril sobre los insectos) y los tratamientos con los hongos aislados.

Palabras clave: Café, control biológico de *Hypothenemus hampei*.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Abstract

Coffee is one of the most sought-after products worldwide and Ecuador is one of the countries recognized for the quality of export coffee. As is known, many of the crops can have problems due to pest insects that damage the plants, fruits, etc. In this case coffee crops are no exception because it is mainly attacked by the coffee bit (*Hypothenemus hampei*), affecting the quality of the berries. The biological control of the coffee bit is one of the strategies that have been chosen to avoid the annual damage that occurs by this pest insect, with entomopathogenic fungi. These fungi have a biopesticide activity that when used in different doses can kill the pest insects of interest. That is why it has been raised as a general objective of this study to assess the *in vitro* effect of the application of entomopathogenic fungi on the pest *Hypothenemus hampei* for the determination of the control exerted by the selected fungus on the insect. For this, fungi from the northwest of Pichincha were isolated, using rice rags and insects to later obtain axenic crops from fungal colonies and dose them on the specimens of *Hypothenemus hampei* in a set period. In the results it was possible to observe the death of the insects; however, this was related to the life cycle of the same and not to the effect of the fungi applied, mainly because no statistically significant differences ($p < 0.05$) were found between the control treatment (application of sterile water on insects) and treatments with isolated fungi.

Keywords: Coffee, biological control of *Hypothenemus hampei*.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Introducción

El café es considerado uno de los cultivos más importantes a nivel mundial desempeñando un papel fundamental en el aspecto económico, social, desarrollo y patrón de vida (Briceño, 2017). Ecuador está dentro de los principales exportadores de café en el mundo y produce la variedad tanto arábica como robusta. Cabe destacar la calidad del café ecuatoriano, razón por la cual es reconocido a nivel internacional debido a programas de desarrollo por parte del gobierno que lo han impulsado en el exterior, donde un 90% de la producción del café ecuatoriano está destinado a exportaciones (Pozo, 2014). Sin embargo, la calidad de los granos se ha visto afectada por plagas como la broca del café, afectando la calidad del grano y por lo tanto poniendo en riesgo las exportaciones del mismo (Briceño, 2017).

En Ecuador se registró por primera vez el ingreso de la broca del café en 1981, en la provincia de Zamora Chinchipe, en la zona de Zumba, logrando dispersarse en todo el territorio nacional con enorme rapidez (Sotomayor & Duicela, 1995). A nivel nacional se han registrado distintos reportes donde los cafetales se han visto afectados por la plaga de la broca de café, la cual ha causado pérdidas millonarias en el sector cafetalero ecuatoriano (Castrillón et al., 2017).

Los datos del rendimiento de café en grano seco en Ecuador demuestran que las cosechas realizadas en 2016 mostraron problemas graves de infestación por la broca en los cafetales, determinando la presencia de un 20 a 30% de infestación en los cultivos de café cuando el porcentaje normal de infestación es del 3% (Fernández , 2020).

La broca del café, *Hypothenemus hampei*, es un insecto endémico de África y actualmente se ha dispersado por todo el mundo (Vega et al., 2015), siendo el principal problema entomológico que afecta la caficultura en muchos países del mundo, debido a que

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

ataca los frutos directamente, reduciendo su calidad y rendimiento, ocasionando en muchos casos la caída prematura de los mismos (Soriano, 2010).

La hembra adulta perfora un agujero en la baya del café, depositando los huevos en el endospermo, lo que da lugar a la eclosión de estos llegando a desarrollarse las larvas, las cuales se alimentan de la semilla del café (Párraga, 2017) y una vez que mudan a adultos dentro de la baya, empieza el apareamiento entre hermanos. Las hembras inseminadas y listas buscan nuevas bayas para ovipositar (Infante et al., 2010). La hembra adulta de la broca del café al emerger de la fase pupa, es capaz de aparearse y realizar posturas al cabo de tres días. El periodo de oviposición se da en 20 días y puede llegar a colocar de dos a tres huevos por día (Bustillo, 2006).

Estudios sobre la dispersión de la broca han demostrado que los frutos infestados que se encuentran en el suelo y que caen como consecuencia del ataque del insecto, se convierten en reservorio de poblaciones y son el principal foco de dispersión del insecto (Soriano, 2010). Además, cabe mencionar que el insecto es capaz de atacar cualquier etapa de desarrollo del fruto, incluidos aquellos almacenados (Párraga, 2017).

En gran parte de cafetales alrededor del mundo y en Ecuador, para lograr el control de este insecto plaga se recurre al uso de sustancias químicas como el endosulfan u otras que básicamente constituyen insecticidas; sin embargo, la acción de esta sustancia se ve limitada, ya que gran parte del ciclo de vida de la broca del café se da dentro de los frutos, siendo difícil por parte del insecticida acceder a la parte interna de la baya. Por otra parte, el uso de estas sustancias llega a generar problemas por contaminación ambiental, riesgos en la salud de los trabajadores, y se generan residuos que se mantienen en el suelo y en la planta, entre otras consecuencias (Bustillo, 2006).

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

El control de la broca del café no ha sido una tarea fácil, por lo cual se han planteado diferentes estrategias para disminuir las poblaciones de insectos que emergen de los frutos infestados y mantener los niveles de plaga por debajo del umbral de daño económico (Pardey, 2005). Dentro de estas estrategias se han planteado diferentes opciones como: el uso de trampas para el monitoreo del insecto empleando atrayentes alcohólicos, incorporación de parasitoides contra el insecto, control cultural, control biológico con hongos entomopatógenos, entre otros (Bustillo, 2006).

El biocontrol o control biológico se refiere al uso de ciertos organismos para el control de plagas de insectos reduciendo la cantidad de estos para que sean menos dañinos de lo que podrían llegar a ser. Los controladores de base biológica son microorganismos o productos que pueden ser producidos por estos, para prevenir o mitigar el daño causado por plagas de insectos (Góngora, 2013).

El control de plagas con hongos entomopatógenos es una alternativa muy importante, ya que pueden ser utilizados contra diferentes insectos plaga y no necesitan ser ingeridos porque pueden invadir al huésped directamente en el exoesqueleto o en la cutícula, y además son capaces de infectar al insecto en cualquier etapa de la vida del insecto como huevos y pupas. Generalmente, el sitio de invasión del hongo se da entre las piezas bucales o en pliegues intersegmentarios donde la humedad es favorable y se promueve la germinación del hongo (Charnley & Collins, 2007).

Ciertos hongos entomopatógenos se distribuyen ampliamente en todo el mundo y la región ecuatoriana no es la excepción, siendo parte de la microbiota natural del suelo, de tal manera que pueden ser aislados de insectos infectados y de la tierra (Alves et al., 2002).

Como hipótesis del trabajo se plantea que los hongos entomopatógenos aislados del noroccidente de Pichincha pueden afectar la supervivencia de la broca del café. Mientras que

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

el objetivo general propone evaluar el efecto *in vitro* de la aplicación de hongos entomopatógenos sobre la supervivencia de la plaga *Hypothenemus hampei* para la determinación del control que ejerce el hongo seleccionado sobre el insecto. Y los objetivos específicos fueron (1) aislar hongos entomopatógenos del noroccidente de Pichincha que puedan ser útiles, para el control de la broca del café y (2) determinar la eficiencia de letalidad de los hongos seleccionados sobre *Hypothenemus hampei* por medio de bioensayos por contacto directo del hongo.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Para la presente investigación se recolectaron especímenes de *Hypothenemus hampei* y se ubicaron trampas para la captura de hongos posiblemente entomopatógenos. El estudio se llevó a cabo en el noroccidente de Pichincha.

Los especímenes de la broca del café se recolectaron de la finca “El Placer”, ubicado en la Parroquia de Nanegal, cantón Quito, provincia de Pichincha con coordenadas 0°07'44.8"N 78°40'41.7"W a una altura de 1184 m.

Las trampas se colocaron cerca de la vía a Yunguilla y se seleccionaron 5 puntos distintos, donde se colocó una trampa en cada lugar, es decir se colocó un total de 5 trampas.

Las coordenadas exactas de los sitios de captura fueron:

- 0°00'17.8"N 78°32'26.8"W, Altura: 2658 m
- 0°00'21.6"N 78°32'30.3"W, Altura: 2618 m
- 0°00'26.0"N 78°32'33.5"W, Altura: 2637 m
- 0°00'32.8"N 78°32'48.0"W, Altura: 2673 m

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

- 0°00'44.4"N 78°33'03.4"W, Altura: 2684 m

Fase de campo

Recolección de especímenes de *Hypothenemus hampei*

La colecta de especímenes de la broca del café se realizó directamente de los frutos de cafetales infestados de la finca “El Placer” y posteriormente se almacenaron en un recipiente de vidrio los frutos infestados.

Colocación de trampas

Se seleccionó el noroccidente de Pichincha debido a la alta biodiversidad que posee y al clima, ya que dicho sector presenta temperaturas entre 18 a 26 °C.

Las trampas se colocaron en orificios de 10 cm de profundidad en el suelo con el objetivo de tener lo más cerca posible las trampas del suelo y asegurarse que las esporas puedan entrar por la parte superior de las trampas y empezar su crecimiento. Después de 2 semanas se procedió a retirar las trampas y se trasladaron a los laboratorios de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK para aislar aquellos hongos de interés.

Fase de laboratorio

Preparación de trampas

Para el contenido de las trampas se cocinó arroz con agua potable hasta llegar a un punto medio en cocción. Adicionalmente, se seleccionó un antibiótico de amplio espectro llamado levofloxacina, el cual se agregó a cada una de las trampas para evitar la contaminación bacteriana y asegurar el crecimiento de hongos. Dentro de cada frasco se colocó 250 g del arroz cocido y se mezcló con 2 mg de antibiótico. También se agregó agua destilada dentro de los frascos que contenían el arroz, para mantener una humedad relativa del

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

60%. Se realizaron un total de 5 trampas y estuvieron conformadas por frascos de vidrio de una capacidad aproximada de 500 mL.

Además, se colocaron varios insectos de distintos tamaños (5 insectos) dentro de cada frasco para ser más selectivos en cuanto al crecimiento de hongos entomopatógenos. Los insectos que se utilizaron fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min y posteriormente fueron enjuagados con agua destilada repetidas veces (Zimmermann, 1986). Los frascos se sellaron con una tela porosa y se ajustaron con una liga.

Aislamiento de los hongos

Inicialmente se mezcló todo el contenido de las trampas en un solo recipiente y posterior a ello se tomó 1 g de muestra para llevar a cabo diluciones seriadas en agua estéril hasta 10^{-7} con el fin de obtener colonias diferenciadas. Para la siembra de las diluciones seriadas se utilizó el medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa) y se trabajó a pH 5 y 7, junto con el antibiótico levofloxacin. Se colocaron 200 μ L de cada dilución en una caja Petri y se distribuyó el inóculo con el asa de Drigalsky sobre el medio de cultivo solidificado. Posteriormente, las cajas se incubaron a 26°C por un período de 7 días para asegurar el crecimiento de los hongos.

Selección y purificación de colonias fúngicas

Una vez obtenidos los cultivos madres mixtos a partir de las diluciones, se seleccionaron distintas colonias para ser resembradas hasta obtener cultivos axénicos. Para ello se empleó un asa de siembra previamente esterilizada para tomar una muestra de los cultivos fúngicos, posteriormente se introdujo el asa con la muestra en un tubo Eppendorf con agua destilada estéril, con el fin de suspender la muestra (micelio). Con la ayuda de una micropipeta se tomó la suspensión y se colocó en la superficie del medio de cultivo solidificado, con el asa de Drigalsky esterilizada se esparció la suspensión.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Para la siembra de las suspensiones con las muestras se empleó nuevamente el medio de cultivo PDA a pH 5 y 7, junto con el antibiótico levofloxacin. Posteriormente se descartó el uso del medio de cultivo PDA a pH 7, dado que no presentaba un mayor crecimiento de micelio a comparación del pH 5.

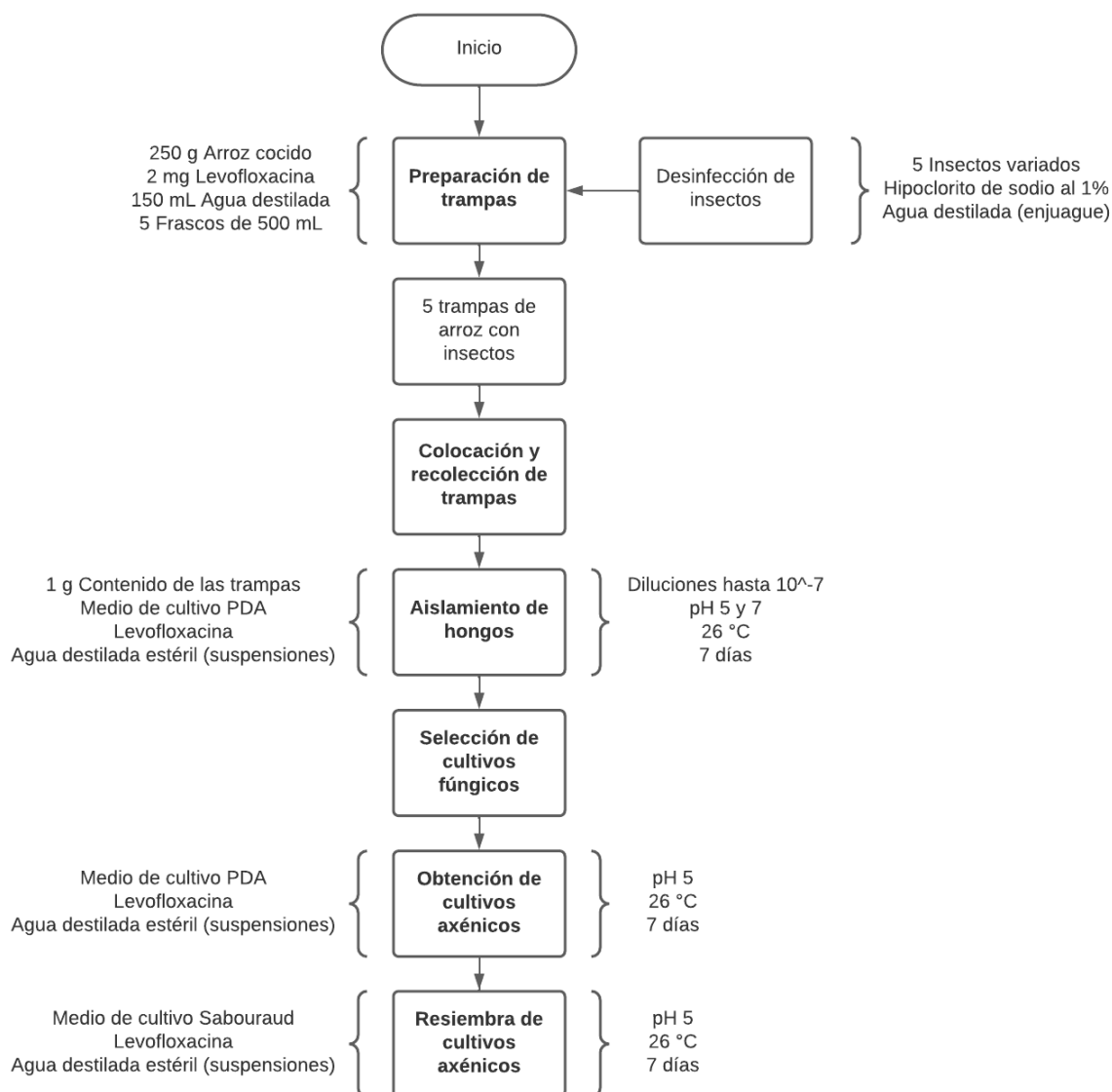
Todo este proceso se realizó repetidas veces hasta garantizar el crecimiento axénico de cada colonia fúngica encontrada. Sin embargo, esta última vez se empleó el medio de cultivo Sabouraud a pH 5, ya que se observó un mejor crecimiento del micelio en el medio, manteniendo el procedimiento antes mencionado.

Al final de todas las siembras y resiembras se sellaron las cajas Petri con Parafilm, se rotularon y se dejaron en incubación durante 7 días a 26 °C con una humedad relativa del 60%. Además, se llegaron a seleccionar tres colonias fúngicas distintas para determinar si presentaban actividad entomopatógena.

En la Figura 1 se visualiza de manera resumida la metodología que se llevó a cabo para la obtención de cultivos axénicos.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología seguida para la obtención de cultivos axénicos



Caracterización morfológica de los hongos aislados

Para la identificación de especies fúngicas entomopatógenas se realizó una identificación morfológica, comparándolas con características morfológicas de hongos filamentosos de bases de datos. Para ello se utilizó la metodología propuesta por Pedrique & Gutierrez (2001), donde se observan características como tamaño, elevación, forma, apariencia general, borde y superficie.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Bioensayos

A partir de los cultivos fúngicos axénicos obtenidos se seleccionaron 3 cultivos axénicos distintos y un control el cual constaba de agua destilada estéril. Se procedió a pesar el micelio de los cultivos axénicos seleccionados para establecer el valor mínimo y manejar la misma cantidad de micelio en todos los ensayos, por lo que se disolvieron 1.36 g de micelio en 15 mL de agua destilada estéril para cada cultivo axénico. Para aplicar estas suspensiones se utilizaron 4 sprays de plástico.

Se seleccionaron 160 brocas sanas en total, las cuales se dividieron en 8 grupos conteniendo 20 brocas cada uno. Por cada tratamiento se realizaron 2 repeticiones; adicionalmente, se incluyó un control que comprendió la aplicación de agua estéril sobre las brocas.

Para los bioensayos se siguió la metodología de Gonzáles *et al.* (1993) y Palacios (2009) con algunas modificaciones. Inicialmente se contabilizaron las 20 brocas por cada tratamiento y se las colocó sobre papel absorbente esterilizado ubicado en cajas Petri, para retirar el exceso de agua una vez que se dispersaran las suspensiones. Como se puede observar en la Tabla 1 se indica de forma resumida la conformación de los bioensayos.

Para proceder a dispensar los tratamientos realizados anteriormente, se agitó el contenido de los frascos con suspensión fúngica por 20 segundos y posteriormente se dispersó 4 veces al aire para asegurarse que la dispersión sobre las brocas del café eran las mismas, y luego se aplicó 10 rociadas sobre los insectos. Esto se realizó en todos los tratamientos.

A continuación, se colocaron los insectos roseados dentro de cajas Petri junto con granos de café pergamino como sustrato alimenticio, y para proveer la humedad necesaria diariamente se les colocó 3 gotas de agua destilada estéril sobre bolitas de algodón esterilizadas ubicadas en cada tratamiento (Gonzáles, Posada, & Bustillo, 1993).

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Tabla 1. Tratamiento, Contenido, N° de repetición y N° de brocas del café para los bioensayos.

Tratamiento	Contenido	N° de Repetición	N° de Brocas del café
T1	Agua destilada estéril (Control)	2	20
T2	Cultivo axénico 1 + Agua destilada estéril	2	20
T3	Cultivo axénico 2 + Agua destilada estéril	2	20
T4	Cultivo axénico 3 + Agua destilada estéril	2	20

Fuente: Autora

La mortalidad de los insectos se evaluó diariamente durante un periodo de 10 días después de aplicar los tratamientos. Empleando un estereoscopio se observó el comportamiento y se contabilizó la mortalidad de las brocas.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis estadístico en el programa Minitab utilizando la prueba de Mann-Whitney empleada para dos muestras independientes, donde se realizó comparaciones por pares entre todos los tratamientos. Se asumió la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos cuando $p < 0.05$.

Resultados

Aislamiento de hongos entomopatógenos

Después de los 7 días de incubación a 26 °C se observó distintas características en cada una de las colonias fúngicas de los cultivos axénicos obtenidos previamente, cuyos resultados fueron los que se pueden ver en la Tabla 2 a continuación.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Tabla 2. Características morfológicas de las colonias fúngicas de los cultivos obtenidos en el medio PDA.

Características de la colonia	Cultivo axénico 1		Cultivo axénico 2		Cultivo axénico 3	
	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso	Anverso	Reverso
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Color	Verde y	Amarillo	Blanco	Blanco	Salmón	Crema
	bordes blancos	cremoso			pálido y bordes blanco	
Elevación	Convexo		Elevada		Umbilicada	
Borde	Entero	Entero	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso	Filamentoso
Superficie	Áspera	Lisa	Suave	Lisa	Suave	Estría
Textura	Polvorienta	Lisa	Algodonosa	Lisa	Velloso-	algodonoso
	Aterciopelada		Aterciopelada			

Fuente: Autora

Determinación de la eficiencia de letalidad de los hongos seleccionados

En el caso de la aplicación de los tratamientos sobre *Hypothenemus hampei* se determinó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, incluido el control.

En la Figura 2 se puede observar que en caso del tratamiento control (T1) se da un marcado incremento en cuanto al número de muertes a partir del quinto día hasta llegar al octavo día, en el noveno y décimo día existe una ligera estabilización; sin embargo, no se sabe con precisión debido a la desviación estándar que presenta en estos dos últimos puntos con valores de 2.12 y 2.82 respectivamente, ya que presentan una mayor desviación de los datos a comparación de los otros puntos.

En cuanto al tratamiento 2 (T2), se puede observar que a partir del primer día se da una prolongada mortalidad de los insectos hasta llegar al séptimo día y a partir de este día se observa una notable estabilización en cuanto al número de muertes. Cabe mencionar que a partir del sexto día en adelante existe una mayor desviación estándar con valores de 3.53 (6.°

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

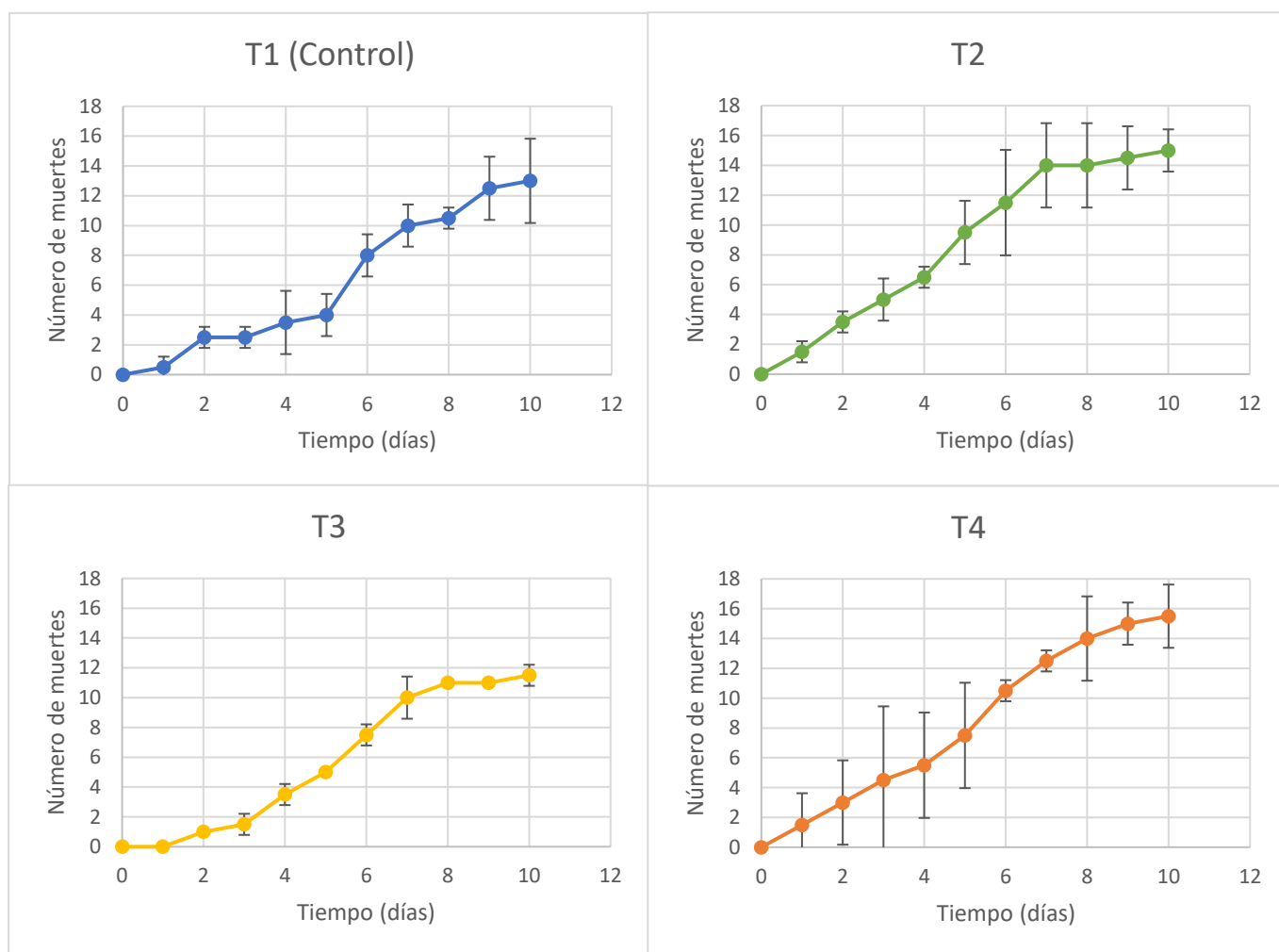
día), 2.82 (7.º día), 2.82 (8.º día) y 2.12 (9.º día), lo que indica que los puntos a continuación podrían estar tanto en el límite superior o inferior de la media marcada en la gráfica.

En el tratamiento 3 (T3) se observa que del tercer al octavo día hay una mayor cantidad de brocas muertas, llegando a estabilizarse sin ninguna diferencia notable al décimo día. En este caso cabe destacar las reducidas desviaciones que se presentan en ciertos puntos, así como también la nula desviación en otros. Los resultados de T3 comparado con T1 presenta menos desviaciones estándar, por otra parte, el comportamiento de las curvas presenta un patrón parecido, donde hay un incremento considerable de muertes y luego llega a estancarse.

En cuanto al tratamiento 4 (T4) se observa que se alcanza rápidamente un número de muertes elevado en comparación con el control, teniendo una pendiente pronunciada. Sin embargo, la desviación estándar es mucho mayor en comparación con el control, ya que hay un mayor margen de desviación desde el primero al quinto día y se retoma a partir del octavo al décimo día. Del primero al quinto día se presentan valores de desviación estándar de 2.12, 2.82, 4.94, 3.53 y 3.53, respectivamente, siendo estos los más significativos, y a partir del octavo al décimo día se calcularon valores de 2.82, 1.41 y 2.12 respectivamente.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 2. Comparación entre el tratamiento 1 (T1), tratamiento 2 (T2), tratamiento 3 (T3) y tratamiento 4 (T4) con respecto al número de muertes de los insectos (*Hypothenemus hampei*) durante el tiempo de experimentación.



Según los resultados de la prueba estadística de Mann-Whitney donde se realiza una comparación de dos muestras independientes entre los tratamientos, se indica que no son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en ninguno de estos. En el caso del T1 con T2 presentó un valor $p = 0.237$, para el T1 con T3 un valor $p = 0.793$ y finalmente en el caso de T1 con T4 un valor $p = 0.341$, con un nivel de confianza de 95.12%.

Discusión de resultados

En este estudio se logró identificar los géneros a los que pertenecen los cultivos axénicos fúngicos obtenidos, siendo comparadas con otros estudios únicamente en base a sus características morfológicas macroscópicas. Dentro del género de estos cultivos encontramos

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

a *Penicillium* y *Fusarium*. Se llegó a estos resultados debido a que las características descritas de cada cultivo son consistentes tanto a las observaciones realizadas en otros estudios como visualmente las imágenes que se presentan en las mismas.

En base a los caracteres morfológicos descritos en la Tabla 2, el cultivo axénico 1 coincide con las características descritas en los estudios de Pacasa-Quisbert et al. (2017) y Seydametova et al. (2012), donde se establece que es un hongo filamentoso del género *Penicillium* (Figura 9). Se halla principalmente en el suelo y es uno de los más abundantes que se pueda encontrar en la naturaleza. Las colonias presentan un crecimiento rápido, llegando a presentar una coloración blanca y a medida que transcurre el tiempo cambia a azul verdoso, verde o gris oliva; mientras que al reverso presenta una tonalidad amarillo cremoso. En cuanto a la textura puede ser algodonosa, aterciopelada, plana o filamentosa, estas características pueden ir variando dependiendo de la especie (*Penicillium* spp., 2016). En base a estas descripciones se puede notar una similitud entre los resultados obtenidos con los estudios mencionados, además al ser un género predominante en el suelo coincide con el origen de la muestra, ya que las trampas que se realizaron para la obtención de hongos fueron colocadas directamente en el suelo.

Dentro del género *Penicillium* hay alrededor de 300 especies encargadas de desempeñar diferentes funciones. En este género se encuentran ciertas especies que son entomopatógenos y tienen el potencial de ser usados para el control biológico de plagas; a pesar de conocer la información sobre la actividad entomopatógena de *Penicillium* sp. hay pocos reportes sobre la aplicación de este hongo sobre insectos (Agus et al., 2015). En un estudio realizado por Al-Keridis (2015) utilizan como modelo de hongo entomopatógeno a *Penicillium* sp. contra el escarabajo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), obteniendo un

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

efecto positivo contra el insecto, ya que utilizaron diferentes concentraciones de extracto fúngico para matarlo.

En el cultivo axénico 2 se consiguieron resultados equivalentes a las observaciones que se realizaron en el estudio de Li et al. (2018), presentando un crecimiento denso de filamentos blancos aéreo, de forma algodonosa a medida que envejecía el cultivo (Figura 10). Visualmente estas características encajan con la especie *Fusarium fujikuroi*, similar a los estudios realizados por Trujillo et al., (2015) y Wang et al., (2021). Mientras que en el cultivo axénico 3, se observó un crecimiento denso del micelio con aspecto vellosos-algodonoso (afieltrado) de color salmón pálido en el centro y alrededor blanco (Figura 11), similar a las observaciones realizadas por Escamilla et al., (2019) en cuanto a la especie *Fusarium chlamydosporum*. Cada colonia es una especie distinta, pero se encuentran dentro del género *Fusarium*. La estimación de las especies en cada caso se basó en aspectos físicos similares a los estudios mencionados; sin embargo, puede que estos resultados no sean precisos y sea necesario realizar identificación molecular.

A grandes rasgos el género *Fusarium* es un hongo filamentoso, generalmente se encuentran en el suelo y en otros sustratos como materia orgánica en descomposición o también en asociaciones patógenas o no patógenas con plantas y otros organismos (Santos et al., 2019). Se distribuye ampliamente alrededor del mundo presentando una variedad de aspectos morfológicos y fisiológicos, además presenta una alta variabilidad en cuanto a rasgos genéticos y factores ambientales pueden alterar la morfología de los cultivos (Ma et al., 2013). A su vez se han reportado muchas especies de *Fusarium* que son efectivos en el control de insectos y exhiben propiedades prometedoras en el control de plagas agrícolas, como causar una alta mortalidad, rápida acción y esporulación abundante (Santos et al., 2019).

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

En la aplicación de los tratamientos sobre *Hypothenemus hampei*, no se detectó ninguna actividad biopesticida por parte de los cultivos axénicos empleados después del tiempo de experimentación evaluado. El nulo crecimiento de los cultivos axénicos sobre el insecto pudo verse afectado por factores como la densidad del inóculo, luz solar, humedad, disminución de la calidad de las esporas y temperatura que influyen en el proceso de infección del insecto plaga (Charnley & Collins, 2007). Por otra parte, otras de las razones que pudieron afectar la tasa de crecimiento de la colonia y la germinación de los conidios después de la dispersión de los tratamientos, puede estar relacionada con la cantidad de agua destilada esterilizada frente a la cantidad de micelio empleado en cada tratamiento. Además, puede que al haber usado agua destilada para los bioensayos no haya sido la opción más viable, dado que los nutrientes del medio en el que se lleguen a suspender determinan el crecimiento de hongos entomopatógenos. Los medios con menor contenido proteico pueden reducir la capacidad de germinación de las esporas (Agus et al., 2015).

Al no visualizarse ninguna forma de crecimiento fúngico sobre la broca del café, así como al no haber identificado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, se estableció que la muerte de los insectos ocurrió debido a muerte natural.

Conclusiones

- En este estudio se logró obtener 3 cultivos axénicos fúngicos del Noroccidente de Pichincha, cuya actividad biopesticida fue evaluada a nivel de laboratorio.
- Los ensayos de actividad biopesticida no demostraron ningún efecto negativo de los cultivos axénicos aislados sobre la supervivencia de *Hypothenemus hampei*, por tanto, se rechaza la hipótesis planteada en este trabajo.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Recomendaciones

- En el caso de las trampas con arroz e insectos es mejor priorizar la cantidad de insectos dentro de las trampas para que se desarrolle específicamente el crecimiento de hongos entomopatógenos que ataquen a *Hypothenemus hampei*, ya que el arroz sirve como sustrato para cualquier especie fúngica que no puede llegar a ser de interés.
- Recolectar en campo brocas u otros insectos naturalmente infectados por hongos, y tratar de realizar el aislamiento de hongos a partir de esos insectos infectados.
- Para una identificación más exacta de los cultivos axénicos fúngicos aislados es necesario realizar una identificación molecular de los cultivos, a través de la secuenciación del gen 18S rRNA, 28S rRNA o la región ITS.

Bibliografía

- Agus, N., Saranga, A. P., Rosmana, A., & Sugiarti, A. (2015). Viability And Conidial Production of Entomopathogenic Fungi *Penicillium* SP. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH*, 4. www.ijstr.org
- Al-Keridis, L. (2015). Application of *Penicillium* sp as Entomopathogenic Fungi to Control the Red Rust Beetle *Tribolium castaneum* (Hbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 12(Special-Edn2), 07–12. <https://doi.org/10.13005/bbra/2165>
- Batista Alves, S., Savoi Rossi, L., Biaggioni Lopes, R., Tamai, M., & Pereira, R. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*.

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Briceño, G. (2017). *Eficacia del control Biológico y Etológico de la broca de café Hypothenemus hampei (ferrari) en los distritos de Huambo y San Nicolás, Provincia Rodríguez de Mendoza, Amazonas.*

Charnley, & Collins. (2007). *Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control* (Vols. The Mycota, vol 4). Berlin: Environmental and Microbial Relationships. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10

Escamilla, D., Rosso, M., & Zhang, B. (2019). *Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments.*

Fernández Aguirre, J. (2020). *Evaluación de la Actividad Biopesticida del Hongo Entomopatógeno Beauveria bassiana sobre la Broca del Café (Hypothenemus hampei).* Cuenca-Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Góngora, C. (2013). *Nuevos hallazgos en el control bilógico de la broca del café.* Caldas-Colombia: SOCOLEN.

Gonzáles , M., Posada, F., & Bustillo, A. (1993). *BIOENSAYO PARA EVALUAR LA PATOGENICIDAD DE Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ, Hypothenemus hampei (Ferrari).* REVISTA COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/275154965_BIOENSAYO_PARA_EVALUAR_LA_PATOGENICIDAD_DE_Beauveria_bassiana_Bals_Vuill_SOBRE_LA_BROCA_DEL_CAFE_Hypothenemus_hampe_i_Ferrari

INSST. (2016). *Penicillium spp.* Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo . Obtenido de

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>

Infante, F., Jaramillo, J., Castillo, A., & Vega, F. (2010). The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 2(2), 129–147. <https://doi.org/10.1163/187498209x12525675906031>

Li, R., Li, J., Zhou, Z., Guo, Y., Zhang, T., Tao, F., . . . Liu, W. (2018). *Antibacterial and Antitumor Activity of Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Ty5 from Dendrobium officinale*. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/325898931_Antibacterial_and_Antitumor_Activity_of_Secondary_Metabolites_of_Endophytic_Fungi_Ty5_from_Dendrobium_officinale

Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium pathogenomics*. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

Mateo Castrillón Cuervo, J., Rodrigo Sanz Uribe, J., & Jimena Ramos Giraldo, P. (2017). ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CAFÉ LAVADO AFECTADO POR LA BROCA DEL CAFÉ. In *Cenicafé* (Vol. 68, Issue 2).

Pardey, A. E. B. (2005). *El Papel Del Control Biológico En El Hypothenemus Hampei (Ferrari)*. Obtenido de https://www.hawaiicoffeeed.com/uploads/2/6/7/7/26772370/el_papel_del_control_biologico_en_el_manejo_i_de_la_b.pdf

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

- Pardey, A. E. B. (2006). Una revisión sobre la broca del café, *hypothenemus hampei* (coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomologia*, 32(2), 101–116.
- Palacios Alas, D. L. (2009). *EFFECTIVIDAD DE LA REPRODUCCIÓN EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO DE LA CEPA NATIVA Beauveria bassiana, COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL FRUTO DE CAFETO, Hypothenemus hampei*. Universidad del Salvador.
- Párraga, Á. G. (2017). *EFFECTO DE TRAMPAS ARTESANALES PARA EL MONITOREO Y CONTROL DE BROCA DEL CAFÉ (Hypothenemus hampei Ferr.) EN EL CANTÓN BOLÍVAR, MANABÍ*. Manabí: ESPAMMFL.
- Pedrique de Aulacio, M., & Gutiérrez de Gamboa, S. (2001). *Obtención de cultivos puros*. Universidad Central de Venezuela. Obtenido de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Obtenci%C3%B3n_de_cultivos_puros.pdf
- Pozo Cañas, M. (2014). *Análisis de los factores que inciden en la producción de café en el Ecuador 2000 – 2011*. Quito.
- Santos, A. C. da S., Diniz, A. G., Tiago, P. V., & Oliveira, N. T. de. (2019). Entomopathogenic Fusarium species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 34, Issue 1, pp. 41–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.12.002>
- Seydametova, E., Salihon, J., Zainol, N., & Convey, P. (2012). Production of Lovastatin by *Penicillium* spp. Soil Microfungi. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 337–339. <https://doi.org/10.7763/ijcea.2012.v3.213>

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Soriano, J. (2010). *Sociedad Colombiana de Entomología "SOCOLEN."* 1–15.

Sotomayor Herrera, I., & Duicela Guambi, L. (1995). *Inventario Tecnológico del Café*. Quevedo.

Trujillo, F., Ramírez, F., & Martínez, G. (2015). *Fusarium spp.*

Vega, F. E., Infante, F., & Johnson, A. J. (2015). The Genus *Hypothenemus*, with Emphasis on *H. hampei*, the Coffee Berry Borer. In *Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species* (pp. 427–494). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417156-5.00011-3>

Wang, W., Wang, B., Sun, X., Qi, X., Zhao, C., Chang, X., Khaskheli, M. I., & Gong, G. (2021). Symptoms and pathogens diversity of Corn *Fusarium* sheath rot in Sichuan Province, China. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82463-2>

Zimmermann, G. (1986). The ‘*Galleria* bait method’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1–5), 213–215. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x>

CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Anexos

Figura 3. Modelo de trampa de arroz con insectos.



Figura 4. Trampa de arroz con insectos después de 2 semanas.

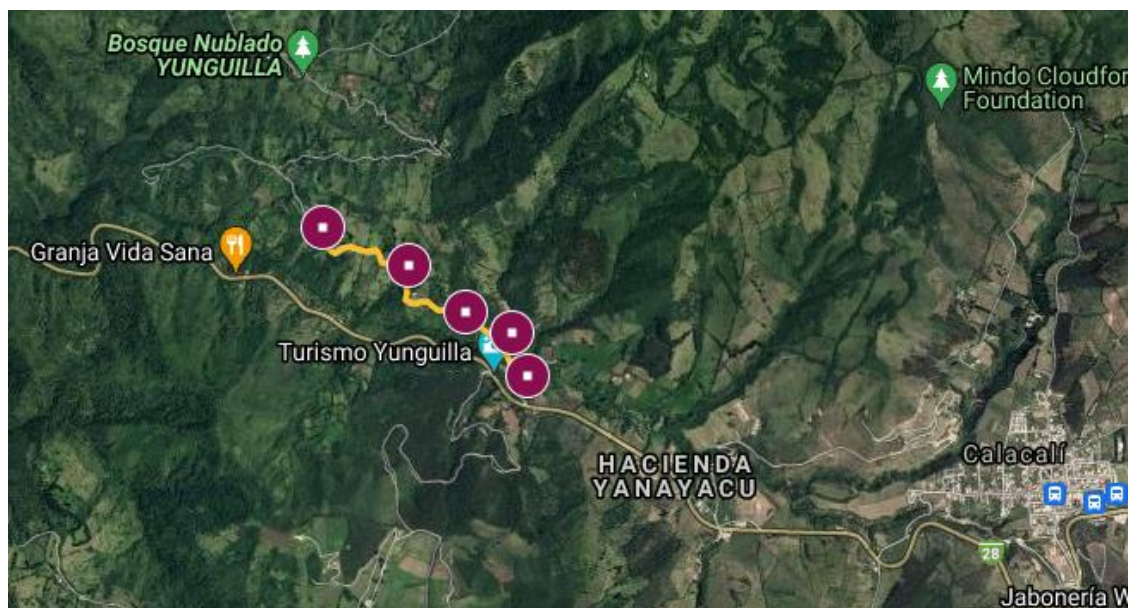


CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 5. Ubicación de la finca “El Placer” donde se recolectaron especímenes de la broca del café.



Figura 6. Ubicación de las trampas de arroz en 5 puntos distintos.



CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 7. Broca del café en café verde.

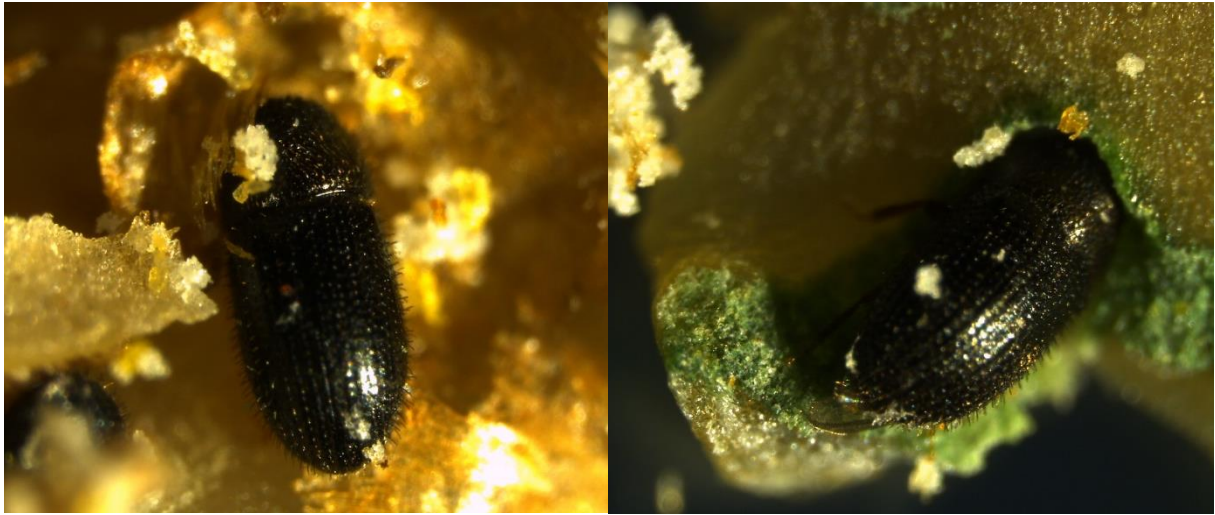
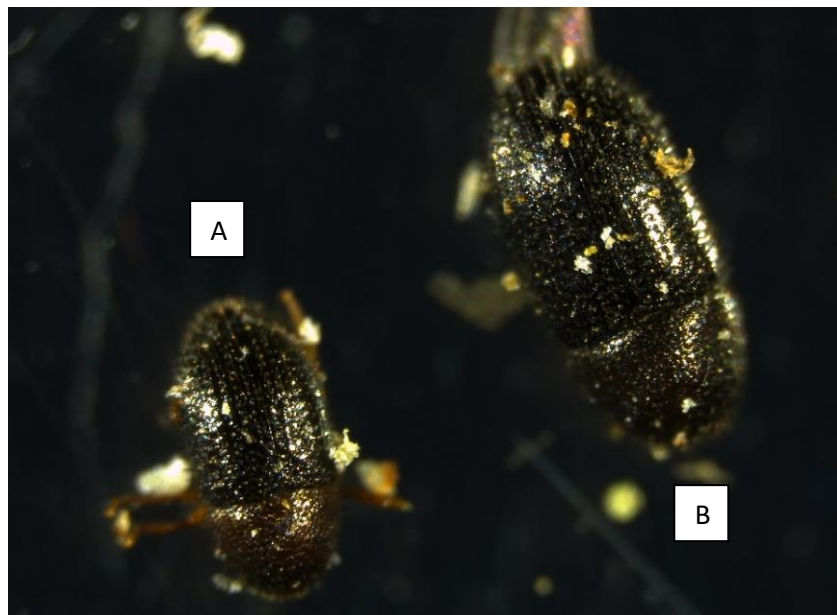


Figura 8. Ejemplares de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). A: Macho y B: Hembra.



CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 9. Cultivo axénico 1 (*Penicillium*) en el medio de cultivo PDA después de 7 días.



Figura 10. Cultivo axénico 2 (*Fusarium*) en el medio de cultivo PDA después de 7 días.



CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 11. Cultivo axénico 3 (*Fusarium*) en el medio de cultivo PDA después de 7 días.



Figura 12. Sprays con suspensiones fúngicas. T1 (control), T2 (colonia 1), T3 (colonia 2) y T4 (colonia 3).



CONTROL BIOLÓGICO IN VITRO DE *Hypothenemus hampei* UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Figura 13. Modelo de los bioensayos, acondicionado con el sustrato alimenticio y algodón humedecido.

