



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
INSTITUTO DE POSTGRADO



Instituto de
Posgrado

MAESTRÍA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES

TEMA:

“DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *Beauveria spp.* A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ECUATORIANA”.

Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Magíster en Gestión
Sustentable de Recursos Naturales

AUTOR: Pablo Roberto Vela Núñez

DIRECTOR: Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti PhD.

IBARRA - ECUADOR

2018

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

En calidad de Director de la tesis de grado titulada “**DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *Beauveria spp.* A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ECUATORIANA**” presentado por: **Pablo Roberto Vela Núñez**, para optar por el grado de Magister en Gestión Sustentable de Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a presentación privada y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Ibarra, a los 10 días del mes de octubre de 2018

Lo certifico

(Firma).....

Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti PhD.

C.C.: 1001914470

DIRECTOR DE TESIS



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA



Instituto de
Posgrado

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1002926358		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Pablo Roberto Vela Núñez		
DIRECCIÓN:	Bartolomé García 1-119 y Obispo Mosquera (Ibarra- Imbabura)		
EMAIL:	velapablo1981@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:	065001065	TELÉFONO MÓVIL:	0958984129
DATOS DE LA OBRA			
TÍTULO:	“DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO <i>Beauveria spp.</i> A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ECUATORIANA”.		
AUTOR (ES):	Vela Núñez Pablo Roberto		
FECHA:	2018/10/10		
SOLO PARA TRAB/AJOS DE GRADO			
PROGRAMA:	<input type="checkbox"/> PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO		
TITULO POR EL QUE OPTA:	Magister en Gestión Sustentable de Recursos Naturales		
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti PhD.		

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es la titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

En la ciudad de Ibarra, a los 10 días del mes de octubre de 2018

EL AUTOR

(Firma).....

Vela Núñez Pablo Roberto

C.C.: 1002926358

DIRECTOR DE TESIS

REGISTRO BIBLIOGRAFICO

Guía: POSGRADO – UTN
Fecha: Ibarra, 10 de octubre de 2018

Pablo Roberto Vela Núñez: “DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *Beauveria spp.* A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ECUATORIANA”, /Trabajo de grado. Magister en Gestión Sustentable de Recursos Naturales. Universidad Técnica del Norte Ibarra.

DIRECTOR: Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti PhD.

El principal objetivo de la presente investigación fue: Desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas del hongo *Beauveria spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana. Entre los objetivos específicos tenemos: Realizar una revisión bibliográfica del estado del arte sobre *Beauveria spp.* Aislar, identificar y caracterizar especies de *Beauveria spp.* nativa. Desarrollar el protocolo para la conservación de *Beauveria spp.* Seleccionar la cepa de mayor potencial a través de la velocidad lineal. Diseñar un catálogo de cepas microbianas puras de *Beauveria spp.*

Fecha: Ibarra, 10 de octubre de 2018

.....
Ing. Julio Amílcar Pineda Insuasti PhD.

Director

.....
Pablo Roberto Vela Núñez

Autor

DEDICATORIA

A Dios, por darme un día más de vida, protección y muchas bendiciones.

A mi familia, a mi esposa María Augusta y a mis adorados hijos Pablo José y Paula Doménica, quienes son mi inspiración para seguir luchando día a día.

A mi madre Olguita y mi padre Milton, quienes con su perseverancia, amor y paciencia inculcaron en mí, el ejemplo de superación y mejora continua.

A mis hermanos Aldrin e Iván, por su apoyo incondicional.

Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

RECONOCIMIENTO

Al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), al Ingenio Azucarero del Norte (IANCEN) y a la Universidad Técnica del Norte (UTN).

Al Dr. Julio Pineda, tutor de la presente investigación, por sus ideas y recomendaciones durante la elaboración y ejecución del presente trabajo.

Al Sr. Jaime Torres, de la comunidad Pueblo Viejo, en donde se realizó el trabajo de campo y recolección de la muestra.

Vela Núñez Pablo Roberto

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE	iii
REGISTRO BIBLIOGRAFICO	v
DEDICATORIA	iv
RECONOCIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPITULO I.....	1
1. Introducción	1
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Problema científico	7
1.1.2. Objeto.....	7
1.1.3. Campo	7
1.1.4. Hipótesis.....	8
1.2. Objetivos de la investigación.....	8
1.2.1. Objetivo general	8
1.2.2. Objetivos específicos	8
1.3. Justificación	8
CAPÍTULO II	9
2. Marco referencial	9
2.1. El reto de la agricultura y la alimentación: Situación global.....	9
2.1.1. Situación actual	11
2.1.2. Situación futura	12
2.2. El reto de la agricultura y la alimentación: Situación global.....	13
2.2.1. América Latina.....	13

2.2.2. Ecuador	14
2.2.3. Zona 1.....	15
2.3. Propuesta al desafío: biocontroladores	16
2.4. Bioinsumos	17
2.5. <i>Beauveria spp</i>	18
2.5.1. Recolección	19
2.5.2. Aislamiento de cepas.....	20
2.5.3. Identificación de especies	22
2.5.4. Caracterización.....	24
2.5.5. Conservación de cepas	25
2.6. Producción de biomasa fúngica.....	26
2.6.1. Preparación del inóculo.....	28
2.6.2. Fermentación.....	28
2.7. Parámetros de operación.....	30
2.7.1. Composición del medio.....	30
2.7.2. Temperatura	32
2.7.3. Humedad	32
2.7.4. Iluminación	32
2.7.5. pH.....	33
2.7.6. Agitación	33
2.7.7. Afinidad de los propágulos	33
2.8. Rendimiento	33
2.9. Banco de recursos genéticos microbiano (BRGM).....	34
2.9.1. Definición.....	34
2.10. Marco Legal.....	36
CAPÍTULO III.....	39
3. Estudio experimental.....	39
3.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de <i>Beauveria spp</i>	39
3.2. Materiales y métodos.....	39
3.2.1. Reactivos	39
3.2.2. Medio de cultivo	39

3.2.3. Equipos.....	40
3.2.4. Material biológico	40
3.2.5. Aislamiento	41
3.2.6. Identificación molecular.....	42
3.2.7. Análisis bromatológico	43
3.3. Protocolo de conservación para la especie <i>Beauveria bassiana</i> por liofilización.....	43
3.3.1. Materiales y métodos	44
3.4. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	47
3.4.1. Materiales y métodos	47
3.4.2. Medición de velocidad de crecimiento	48
3.4.3. Diseño experimental.....	48
3.4.4. Tratamiento estadístico	49
3.5. Catálogo de cepas puras de <i>Beauveria bassiana</i>	49
CAPÍTULO IV.....	51
4. Resultados y discusión	51
4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de <i>Beauveria</i> <i>spp.</i>	51
4.1.1. Resultados	51
4.2.1. Discusiones	54
4.2. Protocolo de conservación para la especies <i>Beauveria bassiana</i> por liofilización.....	57
4.2.1. Resultados	57
4.2.2. Discusiones	58
4.3. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	59
4.3.1. Resultados	59
4.3.2. Discusiones	63
4.4. Catálogo de cepas puras de <i>Beauveria bassiana</i>	64
4.4.1. Resultados	64
4.4.2. Recuperación de cultivos liofilizados	69

4.5. Discusiones.....	71
CAPÍTULO V.....	73
5. Conclusiones y recomendaciones.....	73
5.1. Conclusiones.....	73
5.2. Recomendaciones.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	102
Anexo 1. Proceso de extracción de ADN.....	102
Anexo 2. Ficha Técnica del Liofilizador.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento térmico durante la liofilización.....	46
Tabla 2. Secado primario durante la liofilización	46
Tabla 3. Resultados del análisis bromatológico de <i>B. bassiana</i>	53
Tabla 4. Resultados del análisis de minerales de <i>B. bassiana</i>	53
Tabla 5. Clasificación taxonómica de la cepa en estudio.....	55
Tabla 6. Resumen Estadístico para Velocidad de crecimiento	61
Tabla 7. ANOVA para Velocidad de crecimiento promedio	63
Tabla 8. Listado de cepas de <i>B. bassiana</i>	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de <i>Beauveria</i> spp.	19
Figura 2. Aislamiento de <i>Beauveria</i> a partir de insectos.....	22
Figura 3. Estructuras microscópicas del hongo <i>B. bassiana</i>	23
Figura 4. Fermentadores tipo I y II para la producción de <i>B. bassiana</i> por FEL	29
Figura 5. Producción de <i>B. bassiana</i> por FES: inoculación (a), incubación (b) y cosecha (c).....	30
Figura 6. Ubicación geográfica de la zona de recolección de muestras.....	40
Figura 7. Recolección de muestras de suelo.	41
Figura 8. Proceso de aislamiento de <i>Beauveria</i> spp.....	41
Figura 9. Equipo liofilizador VirTis.....	44
Figura 10. Cepas de trabajo de <i>Beauveria</i> spp. antes de la liofilización.....	45
Figura 11. Cepas puras de <i>Beauveria. bassiana</i>	51
Figura 12. Amplicón del fragmento ITS de la muestra <i>B. bassiana</i> (H001) visualizado en gel de Agarosa 1%	52
Figura 13. Cepas de <i>Beauveria</i> spp. liofilizadas	57
Figura 14. Valores de los parámetros de operación automatizados.	58
Figura 15. Cepas puras de <i>Beauveria</i> spp. en medio MEA (a) y medio PDA (b).....	60
Figura 16. Velocidad de crecimiento de <i>B. bassiana</i> en los MEA y PDA por tratamiento	60
Figura 17. Gráfico de velocidad media por medio de cultivo.....	61
Figura 18. Q-Q plot para la velocidad de crecimiento radial.....	62
Figura 19. Protocolo para el establecimiento de un BRGM para <i>Beauveria</i> spp.....	64

RESUMEN

DESARROLLO DE UN PROCESO A ESCALA DE LABORATORIO PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *BEAUVERIA SPP.* A PARTIR DE LA BIODIVERSIDAD FÚNGICA ECUATORIANA.

Autor: Ing. Pablo Roberto Vela Nuñez

Correo: velapablo1981@gmail.com

Beauveria spp., es un moho cosmopolita, que se encuentra de forma natural en plantas, suelo, sedimentos, entre otros sustratos. Dentro de sus principales aplicaciones se encuentra el de biocontrolador en cultivos agrícolas, ya que presenta actividad antagonista hacia insectos fitopatógenos. Las cepas puras de *Beauveria bassiana* son muy requeridas con fines académicos y/o comerciales, lo que demuestra la importancia de los Bancos de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM). Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas de *Beauveria bassiana*, que promueva el aprovechamiento de la biodiversidad endógena. Se aisló, identificó molecularmente y caracterizó químicamente cepas nativas procedentes de suelo de cafetal, luego se diseñó un protocolo de conservación por liofilización y se elaboró un catálogo de cepas. Se obtuvieron cepas puras de *B. bassiana* con calidad del 99%, identidad genética del 100% y velocidad de crecimiento radial promedio de 6,4 mm/día en medio Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés), que mostró diferencias significativas con Agar Papa-Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés). Las cepas presentaron un alto contenido de Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) y de proteínas, correspondientes al 76,74 y 16,74 %, respectivamente, así como un alto contenido de minerales, principalmente Fósforo, Calcio y Potasio. Para que el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) de *Beauveria bassiana*, funcione, hay que garantizar el cumplimiento de tres características: pureza, viabilidad (patogenicidad) y estabilidad genética; las cuales se recomiendan evaluar en las cepas liofilizadas luego de cierto tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: hongo entomopatógeno, BRGM, aislamiento, identificación, liofilización.

TECNICA DEL NORTE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL
MASTER DEGREE IN SUSTAINABLE RESOURCE
MANAGEMENT

Author: Ing. Pablo Roberto Vela Nuñez

Project Advisor: Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

Year: 2018

"Development of a process at laboratory scale for the conservation and production of native strains of *Beauveria* spp. from fungal Ecuadorian biodiversity"

SUMMARY

Beauveria spp., is a cosmopolitan fungus, which is found in plants, soil, sediments among other substrates in a natural form. Regarding its principal applications, it is used as a biocontroller in agriculture, due to its antagonist activity towards phytopathogen insects. The *Beauveria bassiana* pure strains are strongly demanded for academic and commercial purposes, demonstrating the importance of the Microbial Gene Bank (BRGM, for its initials in Spanish). The objective of this degree work is to develop a process at laboratory scale for the conservation and production of *Beauveria bassiana*'s native strains for its endogenous biodiversity use. Native strains coming from coffee crops land were isolated, molecularly identified and chemically characterized. Subsequently, a conservation protocol by lyophilization was designed and a catalog of strains was elaborated. Pure strains were obtained from *B. bassiana* with a quality of 99%, a genetic identity of 100% and an average radial growth rate of 6, 4 mm/day in Malt Extract Agar (MEA) medium that showed meaningful differences with Potato Dextrose Agar (PDA). The strains presented a high content of Nitrogen Free Extract (76.74%) and a (16, 74 %) of proteins, as well as minerals such as Phosphorus, Calcium and Potassium. For *Beauveria bassiana* BRGM to work, it is necessary to guarantee the fulfillment of these three characteristics: purity, viability (pathogenicity) and genetic stability; which are recommended to be evaluated in lyophilized strains after a certain storage time.

Key words: entomopathogenic fungus, BRGM, isolation, identification, lyophilization

Victor Rodriguez
Pineda



CAPITULO I

1. Introducción

Ecuador es un país mega diverso en términos culturales y biológicos. Se encuentra entre las 17 naciones que albergan más del 70% de las especies terrestres y dulceacuícolas conocidas del mundo, a pesar de que abarca menos del 0.2% de la superficie del planeta (Falconí, 2005).

La Constitución de la Republica de Ecuador, dice en el artículo 400 que “El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola, silvestre y el patrimonio genético del país” (ASAMBLEA-NACIONAL, 2008). Además, permite el acceso a recursos genéticos con fines comerciales y con fines no comerciales (Ecuador, 2011), sin participación económica sobre ellos, pero con participación directa en la titularidad de las modalidades de propiedad intelectual y otros derechos que recaigan sobre procedimientos y productos derivados o sintetizados obtenidos a partir de la biodiversidad, de acuerdo con el artículo 89 del código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, la Creatividad y la Innovación, conocido como Ingenios (Asamblea Nacional. República de Ecuador, 2016).

El Estado ecuatoriano reconoce a la biodiversidad como una ventaja comparativa para el desarrollo científico de las industrias química, farmacéutica y alimenticia, con el fin de viabilizar su uso soberano, estratégico y sustentable. Entre los sectores priorizados en las instancias de planificación nacional y sectorial, se encuentran aquellos que dependen directamente de la naturaleza y sus recursos biológicos, tales como alimentos frescos y procesados, bioenergías, productos farmacéuticos, biotecnología, bioquímica y biomedicina, entre otros (SENPLADES, 2013).

La preservación del patrimonio natural es una prioridad para lograr un desarrollo económico sostenible en el tiempo, por ello, para valorar económicamente la biodiversidad y las funciones ambientales básicas, se emplea el término de “capital natural”, entendido como la interacción entre los humanos y la naturaleza. El “capital natural” es irremplazable y no producible, dado que presta diversas funciones y servicios ambientales, y además porque los cambios en el ambiente causados por actividades humanas son muchas veces irreversibles (Falconí, 2005).

La riqueza y la potencialidad económica de la biodiversidad obliga a pensar que es deber de todos los ecuatorianos cuidar este patrimonio, pues representa un capital cultural y natural que puede convertirse en un aporte para: mejorar la situación actual del estado de conservación de las áreas naturales; incentivar la investigación científica; promover el desarrollo sostenible en toda la población nacional; establecer criterios para una repartición justa y equitativa de beneficios; determinar indicadores de aprovechamiento de las especies silvestres útiles; crear normas que permitan un comercio justo de las especies útiles y/o sus productos derivados, impulsar proyectos biotecnológicos y establecer las herramientas adecuadas para fomentar y proteger los conocimientos tradicionales colectivos de los pueblos y nacionalidades del Ecuador (Granizo & Rios, 2011).

En consecuencia, existe en el Ecuador el Grupo Nacional de Trabajo sobre Biodiversidad (GNTB), y dentro de él varios subgrupos como el de Bioseguridad y Acceso a Recursos Genéticos (Manosalvas, Estrella, Mariaca, & Ribadeneira, 2005), alineados a la Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 (Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE], 2015), los cuales deben instaurar un conjunto de políticas acorde con la legislación nacional, aunque no exista un marco legal nacional que los regule como tal (Blackburn & Boettcher, 2010); lo que sí existe, es un permiso recolección de especímenes de especies silvestres para investigaciones ambientales (Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2013).

El papel de las universidades debe trascender desde la educación y capacitación a la investigación. Es necesario que se entienda que la mejor ruta hacia la planificación es

una base fuerte de conocimiento, más allá de esto, el país requiere desarrollo de tecnologías para el manejo y aprovechamiento de sus recursos. Se requiere cambiar la matriz productiva, desde la parte extractiva a la industrial, para obtener mayores utilidades reinvertibles en el mismo territorio nacional. El Gobierno a través del Ministerio de Ambiente (MAE) debe asumir como política de Estado invertir en procesos de investigación, bajo el entendimiento de que esta es una vía esencial para generar acciones de conservación y desarrollo económico (Peralvo, Campos, Cuesta, & Luna, 2007).

Ecuador es un país con más de 100 mil especies de hongos (Hawksworth, 2001), de las cuales se han descrito tan solo 5 mil (Freire Fierro, 2004) de las 1,5 millones de especies estimadas en la naturaleza (Hawksworth, 1991); sin embargo, se carece de un registro oficial de la cantidad de hongos que se encuentran en el territorio nacional, aunque existen colecciones útiles para la obtención de cepas fúngicas con propósitos académicos (Universidad Técnica Particular de Loja, 2016). Gran parte de los hongos reportados presentan propiedades nutricionales y/o medicinales otorgadas por los metabolitos que producen, lo que es un indicador de su potencial en la industria farmacéutica, cosmocéutica y agro-alimentaria, haciéndose necesaria la inversión en actividades de ciencia, tecnología e innovación para la conformación de Bancos de Recursos genéticos Microbianos (BRGM) con fines comerciales, que permitan el acceso seguro a cepas y el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad fúngica nativa (NexoLOCAL.COM, 2016).

Un censo realizado en agosto de 2015 arrojó que ninguna de las 128 patentes biológicas registradas en el Instituto Ecuatoriano de Propiedad Intelectual, contaba con permiso de explotación, lo que demuestra la susceptibilidad del Ecuador a la biopiratería, principalmente por parte de las multinacionales, quienes son por lo general las titulares de la mayoría de las patentes (Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual, 2016).

El desarrollo de bioproductos constituye una forma de valorización de la biodiversidad a través de la biotecnología (Quezada *et al.*, 2005). Los bioinsumos surgieron como

respuesta a la demanda mundial de alimentos trazables, inocuos y ecológicos. Son elaborados a partir de microorganismos, los cuales se seleccionan por su capacidad de promover el crecimiento vegetal y/o contribuir al control de enfermedades y plagas, por lo que pueden dividirse en biofertilizantes, biocontroladores y mixtos (Nora Altier, Elena Beyhaut, 2012).

El objetivo de usar los biocontroladores es disminuir la población de la plaga llegue hasta un nivel donde ya no sea dañina, además, es una práctica económica, que no genera resistencia en las plagas, no pone en riesgo la salud de los fumigadores y no afecta el medio ambiente (Hanke, 2012^a). Algunos de los productos orgánicos utilizados en el biocontrol de enfermedades se incluyen hongos como *Trichoderma harzianum* y *Beauveria bassiana*, actinomicetos como *Streptomyces griseoviridis* y bacterias como *Bacillus subtilis*. (Murillo, Rueda, García, & Ruiz Espinoza, 2010).

1.1. Problema de investigación

Todas las especies existentes están destinadas a desaparecer a raíz de efectos evolutivos y cambios en el ambiente. La Tierra está en un proceso de extinción continua, que a la par, propicia el surgimiento de nuevas formas de vida en los nichos y hábitats dejados por sus predecesoras. Como resultado de ambos procesos, se estima que en la actualidad subsiste menos del 1% del total de las especies que han existido desde el inicio de la vida en el planeta (Slobodkin, 1986).

En cuanto a los procesos antrópicos, se conocen al menos tres actividades humanas negativamente relacionadas con la biodiversidad: en primer lugar, la destrucción de los ecosistemas; en segundo lugar, la homogeneización de plantas, animales y microorganismos mediante transgénesis u otras técnicas moleculares; y, en tercer lugar, la deformación de los procesos de reciclaje de la materia orgánica, mediante el desajuste, a gran escala del destino dado a los desechos orgánicos generados en el procesamiento agrícola, doméstico e industrial (Gómez, 2011).

En el Ecuador la conservación de la biodiversidad es relevante ya que aquí convergen los Andes, la Amazonía y la Cuenca del Pacífico, lo que determina un mosaico de elementos naturales (clima, ecosistemas, altitud...), donde las comunidades bióticas se han desarrollado adaptándose a las cambiantes circunstancias del medio (E. Estrella, 1993). La gran diversidad biológica y la extraordinaria variedad de los sistemas coexisten en un territorio relativamente pequeño y facilitan a la población el acceso a los recursos naturales, dotándoles de incontables oportunidades para impulsar el desarrollo sustentable (Paspuel, 2002).

La riqueza genética que posee el Ecuador y su aprovechamiento potencial como una fuente de ingresos económicos depende en gran medida de la conservación de la biodiversidad. Es necesario crear mecanismos efectivos de control de las principales amenazas al patrimonio biológico del país, tales como la deforestación, la biopiratería, las actividades extractivas no controladas, la contaminación, etc. (Martínez, 2013). La deforestación constituye la principal amenaza para la biodiversidad ecuatoriana, aumenta principalmente a causa de la expansión de la frontera agrícola, la explotación forestal, la conversión de bosques en plantaciones agroindustriales, el crecimiento urbano y el impacto provocado por la explotación petrolera y minera en áreas naturales (Suárez *et al.*, 1997).

Ecuador al igual que el resto de países biológicamente diversos se caracteriza por tener una economía en desarrollo e infraestructura científica limitada, por lo que rara vez desarrolla tecnología innovadora que permita el aprovechamiento óptimo de sus recursos genéticos. Son por lo general los países desarrollados, quienes realizan las investigaciones, producen la novedad científica y explotan económicamente el conocimiento (Kate & Laird, 2000).

El lograr la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad del país, implica beneficios económicos sin agotar el recurso, para asegurar las posibilidades de aprovechamiento de las próximas generaciones. La biodiversidad puede conservarse mediante dos estrategias: *in situ* y *ex situ* (J. Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Ribadeneira, 2005).

Ecuador es un país con gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales tienen potencial industrial inexplorado. La obtención de cepas puras y su almacenamiento en BRGM es imprescindible para la conservación de la biodiversidad y su aprovechamiento sostenible con fines industriales y académicos (Badía, Hernández, Murrel, Mahillon, & Pérez, 2011; Cruz, 2004; Ramírez & Cocha, 2003). Existen en el Ecuador tan sólo dos BRGM, coordinados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE, 2016) y la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) (Cruz, 2004). Pese a que la legislación nacional promueve el aprovechamiento sostenible de los recursos genéticos, el impacto científico e industrial de los dos BRGM no ha sido muy notorio debido a falencias tecnológicas (Asamblea Nacional, 2008).

El hecho de que la principal actividad económica del Ecuador sea la agricultura y que la legislación nacional promueva el uso de tecnologías limpias, hace idóneo al país para suplir la creciente demanda del mercado de productos orgánicos y amigables con el medio ambiente (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES), 2017).

El uso de agroinsumos de origen biológico permite la producción limpia de alimentos, conforme con los requerimientos del mercado. Los agroinsumos más demandados son los biocontroladores, en especial, para el control de plagas de insectos (OCDE/FAO, 2013).

En el suelo hay diversidad de hongos entomopatógenos con gran potencial como agentes de control biológico de insectos para poblaciones plaga objetivo (Pucheta, Flores, Rodríguez, & Torre, 2006). El uso de estos hongos como biocontroladores, constituye un componente de los programas de manejo integrado de plagas y una alternativa viable para los productores agrícolas, ya que es amigable con su salud y con el medio ambiente (Cañedo & Ames, 2004).

El desarrollo de productos a base de hongos entomopatógenos debe involucrar investigación para determinar el nivel de interacción del hongo con su hospedero y con

el medio ambiente, la concentración del producto y el método de formulación adecuado que permita llevar estos microorganismos a condiciones de campo para que desempeñen una función de buena capacidad reguladora de las plagas dentro del agroecosistema (Motta & Murcia, 2011).

Uno de los géneros más importantes dentro del grupo de hongos entomopatógenos es *Beauveria spp.*, un género cosmopolita de hifomicetes presentes en el suelo, de interés como un sistema modelo para el estudio de entomopatogénesis y el control biológico de insectos plaga (Rehner & Buckley, 2005).

Pese al potencial del Ecuador para ser líder en el mercado de productos agrícolas orgánicos falta más investigación para la producción de biocontroladores a partir de cepas nativas, que permita el aprovechamiento de la biodiversidad (Asamblea Nacional, 2008).

1.1.1. Problema científico

Del análisis anterior se evidencia el limitado conocimiento en el manejo sustentable hongos entopatómogenos nativos del genero *Beauveria spp.*, en el Ecuador, en cuanto al proceso de obtención de cepas puras.

1.1.2. Objeto

El Proceso de producción de *Beauveria ssp.*, para la conservación del recurso genético ecuatoriano.

1.1.3. Campo

Manejo de recursos naturales, recursos genéticos, biodiversidad fúngica y biotecnología.

1.1.4. Hipótesis

Si se desarrolla un proceso a escala de laboratorio para la producción de cepas nativas de *Beauveria spp.* se promovería el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad fúngica nativa.

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar un proceso a escala de laboratorio para la conservación y producción de cepas nativas del hongo *Beauveria spp.* a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar una revisión bibliográfica del estado del arte sobre *Beauveria spp.*
- Aislar, identificar y caracterizar especies de *Beauveria spp.* nativa.
- Desarrollar el protocolo para la conservación de *Beauveria spp.*
- Seleccionar la cepa de mayor potencial a través de la velocidad lineal.
- Diseñar un catálogo de cepas microbianas puras de *Beauveria spp.*

1.3. Justificación

El uso excesivo de plaguicidas provoca efectos negativos en el suelo, el agua y el ambiente. Además, ha contribuido a aumentar los problemas de plagas debido al desarrollo de resistencia y a la destrucción de los enemigos naturales. Muchos plaguicidas también afectan la salud de las personas.

CAPÍTULO II

2. Marco referencial

2.1. El reto de la agricultura y la alimentación: Situación global

En el siglo XIX se afirmaba que la población aumentaba exponencialmente mientras que los alimentos se producían aritméticamente (Malthus, 1846), prediciéndose una supuesta hambruna masiva a causa del aumento poblacional (Ehrlich, 1968). A raíz de esto, los gobiernos propusieron y ejecutaron políticas demográficas que cesaran el boom poblacional de la primera mitad del siglo XX; así como agrarias que promovieran la siembra de variedades mejoradas de plantas y el uso de agroquímicos para aumentar el rendimiento de los cultivos, lo que se denominó *revolución verde* (Sumpsi, 2012^a). Sin embargo, se desataron discusiones sobre la conveniencia del uso de agroquímicos, ya que estudios aseveraron su efecto negativo en el medio ambiente y la salud humana.

Los pesticidas empezaron a emplearse durante la segunda mitad del siglo XX, promovidos por el gobierno en respuesta a la llamada “Revolución verde” que pretendía aumentar la productividad del agro para poder responder a la creciente demanda mundial de alimentos (Griehop y Winter, 1989). Una plaga es cualquier planta, animal o microorganismo que aumenta su densidad poblacional de tal manera que afecta negativamente (directa o indirectamente) al ser humano y sus actividades antrópicas; en el caso de la agricultura esto se traduce en pérdidas económicas (Brechelt, 2010).

Los plaguicidas pueden ser insecticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, molusquicidas, nematocidas, reguladores del crecimiento de las plantas, entre otros (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Los pesticidas de mayor impacto son endosulfán, clorpirifós, cipermetrina (Ronco *et al.*, 2008), lambdacialotrina,

carbofurano y fipronil (Vieira, Noldin, Deschamps, & Resgalla, 2016), los cuales son contaminantes recalcitrantes para el medio ambiente, pudiéndose encontrar volatilizados en el aire, la lluvia, las nubes y la neblina representando un riesgo para los seres vivos no objetivo (Kommanet, 1998); tal es el caso de los animales no diana, quienes ven afectadas su funciones reproductivas e inmunológicas, mientras que las plantas no diana presentan disminución de rendimientos y mayor susceptibilidad a enfermedades. El uso de plaguicidas ocasiona en el suelo pérdida de fertilidad, al disminuir la flora microbiana benéfica que participa en los ciclos del carbono y del nitrógeno, vitales para la nutrición vegetal (Aktar *et al.*, 2009). El desequilibrio en el ecosistema de los cultivos agrícolas incide negativamente en la calidad de vida de los agricultores y la salud de los consumidores (Duarte, 2012); la exposición prolongada del hombre a agroquímicos puede afectar el sistema respiratorio, nervioso y circulatorio, así como enfermedades de la piel (P L Pingali, Marquez, Palis, & Rola, 1995), alteraciones endocrinas (Campos & Freire, 2016), hiperlipidemia en fetos (Monteagudo *et al.*, 2016), entre otras enfermedades.

Está reportado que muchas de las nuevas enfermedades son provocadas por la baja calidad de los alimentos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2002) y que los factores ambientales son responsables de más del 24 % de la carga mundial de enfermedad y de aproximadamente el 36 % de las muertes de los niños (Prüss-Üstün & Corvalán, 2005). Los alimentos son la fuente con mayor nivel de trazas de pesticidas a la que se expone el hombre; se reporta que está alrededor de mil a cien mil veces más contaminado que el aire y el agua (Margni, Rossier, Crettaz, & Jolliet, 2002).

Con el transcurso de los años, las plagas se han hecho resistentes a los pesticidas, haciendo necesario aumentar la dosis del químico para lograr el mismo efecto, lo que aumenta los costos de producción y la contaminación ambiental (Laxminarayan, 2003). Una forma de cuantificar el impacto de dichos químicos es mediante el método de evaluación del ciclo de vida medioambiental (Margni *et al.*, 2002).

2.1.1. Situación actual

Para enfrentar el reto de alimentar a la población se creó en 1994 el Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) con el objetivo de reducir la incidencia del hambre y la malnutrición en países en Desarrollo (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2003); y en Noviembre de 1996 se firmó en el marco de la primera Cumbre Mundial sobre la Alimentación, la Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial, donde los países se comprometieron a realizar un esfuerzo mutuo para erradicar el hambre (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 1996), lo que se reafirmó años después durante la Declaración del milenio (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2000). En la Cumbre Mundial sobre la Alimentación del año 2009 “se reconoció la importancia de la agricultura sostenible como una forma de aumentar la producción sin afectar el medio ambiente, y se manifestó el compromiso los países para gestionar políticas que permitan a los pequeños agricultores acceder a tecnologías agrícolas sostenibles mediante créditos, subvenciones, capacitaciones, entre otras estrategias” (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2009a).

Pese a ello existen todavía 800 millones de personas en situación de desnutrición crónica a nivel mundial (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2015); sumado a esto, la población mundial ha aumentado el 29 % en los últimos 30 años (Banco Mundial [BM], 2016), mientras el consumo de alimentos por persona, en términos calóricos lo ha hecho el 17 % (Alexandratos & Bruinsma, 2012), lo cual resulta paradójico ya que aún persiste la desnutrición en países en desarrollo debido principalmente a la inequitativa distribución de los alimentos a nivel mundial: hay comunidades donde el alimento es insuficiente, mientras en otras las dietas son hipercalóricas, conduciendo a su poblaciones con desnutrición y obesidad, respectivamente (van Mil, Foegeding, Windhab, Perrot, & van der Linden, 2014).

La agricultura sostenible, la salud ambiental, la rentabilidad económica y la equidad social pueden mediante prácticas como la diversificación de los cultivos, la conservación de la biodiversidad, la gestión integrada de plagas, la gestión sostenible

del agua, las prácticas adecuadas de poscosecha, entre otros (Verma, Jaiswal, Meena, Kumar, & Meena, 2015).

En vista del impacto de los agroinsumos de origen sintético y del grado de concientización de los gobiernos, cobran cada vez más importancia los biocontroladores y la agricultura orgánica (Murillo *et al.*, 2010). Sin embargo, es necesario implementar estrategias de promoción para la difusión de dichas tecnologías agrícolas sostenibles, ya que los países en desarrollo consumen el 70 % de los agroquímicos del mundo (Alexandratos & Bruinsma, 2012), y el aumento de su consumo por año es del 5,4 % (Oerke & Dehne, 2004), lo cual es alarmante. Esta conducta inadecuada se debe principalmente a la necesidad de asegurar su supervivencia económica; el desconocimiento del impacto negativo de los plaguicidas; y la falta de diagnóstico del estado de su salud por exposición a estos químicos. Los productores ignoran que el retorno de inversión en los biocontroladores es constante mientras los plaguicidas es alto al inicio, pero con el tiempo presenta un descenso abrupto, ya que se deteriora la calidad de los recursos naturales y habría que hacer una mayor inversión de dinero en su recuperación (Wilson & Tisdell, 2001).

2.1.2. Situación futura

Se estima que para el año 2050 la población mundial aumentará un 35%, y que la población urbana pasará a representar el 70 % de la población, en contraste con el 49 % actual; por lo cual la producción mundial de alimentos debe aumentar un 70 % y duplicarse en los países en desarrollo (Sumpsi, 2012^a); inclusive, el consumo de alimentos por persona aumentará un 11 % (Alexandratos & Bruinsma, 2012). Lo anterior evidencia la necesidad de aumentar la producción agrícola para responder a la demanda mundial de alimentos. Según la FAO (2009b), el 90 % del aumento de la producción para el año 2050 provendrá del acrecentamiento del rendimiento de los cultivos, mientras que el porcentaje sobrante corresponderá a un aumento de la superficie cultivada, lo que deriva en una disminución de la superficie agraria por habitante (Karunasagar & Karunasagar, 2016).

La seguridad alimentaria y la erradicación del hambre son los retos ambientales del momento (Karunasagar & Karunasagar, 2016). Sumpsi (2011) menciona que las iniciativas para afrontar dichos retos se verán obstaculizadas por el cambio climático que afectará la productividad agrícola y la disminución de disponibilidad de ciertos productos agrícolas que serán usados como insumos para la producción de biocombustibles, por lo que el crecimiento de la productividad será de alrededor del 0,8 % anual, valor muy bajo en contraste con el 2,1 % anual reportado durante la primera década del siglo XXI (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2009b; OCDE/FAO, 2013).

Por otro lado, el mercado es cada vez más exigente, requiriendo productos además de inocuos amigables con el medio ambiente, lo que aumenta la necesidad de impulsar e implementar tecnologías sostenibles (Lamichhane *et al.*, 2016).

2.2. El reto de la agricultura y la alimentación: Situación global

2.2.1. América Latina

El 11 % de la producción mundial de alimentos son producidos en América Latina y el Caribe (ALC) que posee el 24 % de las tierras cultivables del mundo (Inter-American Development Bank [IDB], 2016). La tasa de crecimiento del sector agrícola en los últimos tres años fue del 2,9 %, mayor que el crecimiento de la economía en 0,3 puntos porcentuales, lo que se debió al aumento de la producción agrícola en 3,2 %, principalmente por el crecimiento de la productividad (2,2 %) y en segunda instancia por la expansión de la superficie de cultivo. Dicho Crecimiento fue notorio principalmente en Sudamérica, donde se presentaron elevados volúmenes de cereales y oleaginosas durante 2013-2014, que a diferencia de Centro América presentó condiciones climáticas favorables. (Comisión Económica para América Latina y el Caribe [CEPAL], FAO, y Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2015).

Pese a estos inconvenientes, los países de la región han ejecutado esfuerzos significativos para acrecentar la productividad agrícola y el valor agregado de los productos. El aumento de la productividad se debió a la adopción de tecnologías e innovaciones como la transgénesis, labranza cero y producción bajo ambientes protegidos, principalmente. También hubo un aumento del grado de concientización de los productores agrícolas sobre el cambio climático, por lo que se ha visto un aumento del uso de bioinsumos, que todavía no es generalizado, pero es tendencia (CEPAL *et al.*, 2015).

2.2.2. Ecuador

Los fertilizantes contribuyen en gran parte a los altos costos de producción de la agricultura, ya que corresponden al 22 % mientras que los agroquímicos constituyen tan sólo el 6,7 %. Para afrontar este problema, el gobierno ecuatoriano promovió durante el año 2015 disminuciones del 11 % en el Índice de Fertilizantes (IPF) y del 0,3 % en el Índice de Agroquímicos (IPI) (Monteros Guerrero y Salvador Sarauz, 2015).

Los pesticidas empezaron a emplearse durante la segunda mitad del siglo XX, provenientes de subvenciones estatales en respuesta a la llamada “Revolución verde” que pretendía aumentar la productividad del agro para poder responder a la creciente demanda mundial de alimentos; sin embargo, con el tiempo se fue demostrando el efecto nocivo de estos químicos en el ser humano y el medio ambiente (Grieshop y Winter, 1989). Pese a ello, todavía se siguen empleando los plaguicidas debido a falta de conocimientos sobre el manejo de pesticidas, tecnología obsoleta y poca capacidad de adquisición de otros agroinsumos de menor impacto (Love y Pollanis, 2015).

Hoy por hoy, el Ecuador constituye una zona de emergencia puesto que se reporta que las áreas de producción de maíz son susceptibles de enfermedades virales y fúngicas, previéndose la importación del maíz para suplir la demanda nacional (Subsecretaría de Tierras y Reforma Agraria [STRA], 2016). En vista de la necesidad de aumentar la

productividad agrícola de forma sostenible es recomendable la Gestión Integrada de Plagas (GIP) con agentes biológicos.

2.2.3. Zona 1

La problemática de los pesticidas afecta principalmente a Carchi, cuyos cultivos de papa han sido tratados con pesticidas desde la década de los 60's. Dentro los principales pesticidas empleados se encuentran fungicidas como ditiocarbamatos de metales e insecticidas como organofosforados y carbofuranos, los cuales son aplicados sin medidas de protección, ya sea por presión social en términos de masculinidad, desconocimiento y no disponibilidad de indumentaria apropiada, provocando intoxicaciones de diverso grado de gravedad y contaminación de ambientes naturales aledaños. En consecuencia, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) realizó en la década de los 90's ciclos de transferencia de conocimiento al campesinado relacionadas con la gestión integrada de plaguicidas y sostenibilidad. A partir de allí, se siguieron realizando reuniones, capacitaciones y conferencias relacionadas con el impacto de los plaguicidas en la Salud, la Producción y el Medio Ambiente, hasta que la presión de la industria de los plaguicidas persuadió al gobierno para retirar el apoyo a la causa (Cole, Sherwood, Crissman, Barrera, y Espinosa, 2002; Crissman, Cole, y Carpio, 1994).

Durante la primera década del siglo XXI se siguieron presentando casos de intoxicación y contaminación severos a raíz del uso intensivo de pesticidas (Hurtig *et al.*, 2003), pero con la financiación del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (IDRC) y otros actores sociales se ha logrado encontrar formas de reducir el uso de pesticidas y la exposición de las familias de los agricultores, sin afectar los rendimientos. Pese a ello, la tasa de intoxicación por plaguicidas en Carchi se encuentra entre las más altas del mundo, ya que en esta zona trabajan con los plaguicidas más peligrosos del mundo y las preparaciones para fumigar son usualmente preparadas en casa, involucrando a todos los miembros del hogar. Se reporta que 4 de cada 100 habitantes sufre intoxicación mientras que 4 de cada 10 000 fallecen por esta causa (Mera-Orcés, 2001; Stephen, 2003). Al mismo tiempo, un

estudio demostró que los pesticidas son inhibidores de la coliestereasa, disruptores endocrinos, carcinógenos (Crissman *et al.*, 1994; Srivastava y Singh, 2013) y causantes de retraso en el crecimiento de los niños del Carchi, así como de anomalías neuroconductuales (Grandjean, Harari, Barr, y Debes, 2006).

2.3. Propuesta al desafío: biocontroladores

El aumento de la productividad agraria debe lograrse mediante la aplicación de tecnologías sostenibles que permitan responder a la aumentada demanda de alimentos y a las exigencias del mercado en términos de calidad e inocuidad. Sumpsi (2012) propone cuatro tecnologías sostenibles económica y ambientalmente:

- La agricultura de conservación, que se basa en el laboreo mínimo o nulo de la tierra, y la siembra de cultivos asociados o intercalados
- La agricultura de precisión para el uso eficiente de fertilizantes y del agua de riego
- La Gestión Integrada de Plagas y enfermedades, que combina el uso de variedades de plantas resistentes y el uso razonable de pesticidas
- La conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, mediante la biotecnología, específicamente la mejora genética (p. 5-6).

En cuanto a las propuestas biotecnológicas, existen todavía polémica por la conveniencia del uso de la transgénesis debido a sus hipotéticos efectos en negativos en la salud humana y el medio ambiente, principalmente, así como en los costos de producción, ya que las variedades transgénicas son estériles, es decir que, sus semillas no germinan y hay que comprar nueva semilla a las multinacionales (Morales Estupiñán, 2001).

La Gestión Integrada de Plagas (MIP) se considera la opción más viable, ya que su propósito es la obtención de cultivos sanos con el menor impacto ambiental (Duarte, 2012). El biocontrol constituye una estrategia biotecnológica ecológicamente limpia y

compatible con la agricultura orgánica y el MIP (Monte & Llobell, 2003), su objetivo es “crear un equilibrio entre las plagas y los biocontroladores, de modo que la plaga llegue a un nivel donde ya no sea dañina”. El biocontrol es la práctica convencional de control de plagas más conveniente, ya que es económico, no genera resistencia en las plagas, no representa un riesgo para la salud humana y es ambientalmente amigable (Hanke, 2012^a).

2.4. Bioinsumos

Los bioinsumos surgieron como respuesta a la demanda mundial de alimentos trazables, inocuos y ecológicos. Son productos fabricados a partir de microorganismos (hongos, actinomicetos y bacterias) que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, directamente al facilitar la absorción de nutrientes por la planta o indirectamente al contribuir al control de enfermedades y plagas (Murillo *et al.*, 2010; Nora Altier, Elena Beyhaut, 2012); por lo tanto, pueden dividirse en biofertilizantes y biocontroladores, aunque a veces la misma cepa microbiana posee ambas funciones (Altier, Beyhaut, Rizza, & Rivas, 2012); tal es el caso de *Trichoderma spp.* y *Beauveria spp.*, que aparte de parasitar hongos patógenos de plantas inducen el crecimiento de las plantas y fortalecen su respuesta inmunitaria tanto localizada como sistémica (Dou *et al.*, 2014; Elliot *et al.*, 2000; J. F. White *et al.*, 2002).

Los microorganismos con potencial como biocontroladores deben ser cepas de rápido crecimiento, esporulación abundante, alta patogenicidad a plagas objetivo y bajos costos de producción. Adicionalmente, las formulaciones microbianas deben presentar larga vida de anaquel (aprox. 18 meses) a condiciones ambientales, sin perder considerablemente su infectividad (Couch & Ignoffo, 1981).

La producción de bioinsumos es una forma de valorización de la biodiversidad que permite su aprovechamiento económico sosteniblemente (Quezada, Roca, Szauer, Gómez, & López, 2005b; Ramón *et al.*, 2005b), lo que representa una ventaja comparativa para los cinco países miembros de la Comunidad Andina de Naciones

(CAN), entre los que se encuentra Ecuador; ya que poseen alrededor del 25 % de la biodiversidad mundial (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Ribadeneira, 2005).

2.5. *Beauveria spp*

Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de artrópodos terrestres, ya que los infectan hasta causarles la muerte; por lo que estos hongos constituyen importantes reguladores de las poblaciones de insectos susceptibles en los ecosistemas terrestres (Hajek, 1997). Además, estos hongos pueden vivir endófitamente entre células vegetales sin causar efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Gómez-Vidal, Salinas, Tena, & Lopez-Llorca, 2009). En consecuencia, han sido usados por varios años como biocontroladores de plagas de insectos en cultivos agrícolas, como alternativa para los insumos agrícolas sintéticos (Altier *et al.*, 2012). Entre los insectos susceptibles a *Beauveria spp.* se encuentran el escarabajo de la patata de Colorado, *Lepitotarsa decemlineata* (Allee, Goettel, Gol'berg, Whitney, & Roberts, 1990); la hormiga roja de fuego, *Solenopsis invicta Burenk* (Bradleighvinson & Siebeneicher, 1991); la oruga de pino, *Dendrolimus Punctata Walker* (Long & Du, 1988); la cucaracha alemana, *Blattella germánica* (Cai & Liu, 1988); el barrenador menor, *Elasmopalpus hgnosellus* (McDowell, Funderburk, Boucias, Gilreath, & Lynch, 1990); el gusano falso medidor, *Trichoplusia ni* (Ignoffo, García, Kroha, & Crouch, 1982); el gusano de seda de mora, *Bombyx mori* (Y. X. Huang, 1988); el saltamontes migratorio, *Melanoplus sanguinipes* (Feng, 1994); piojo harinoso, *Planococcus ficus* (Rondot & Reineke, 2016); entre otros.

Beauveria spp. es un hongo entomopatógeno que infecta a los insectos mediante sus conidiosporas (propágulos asexuales), que se adhieren a la cutícula huésped, donde se desarrollan los tubos germinativos e invaden el hemocele. La invasión es posible gracias a las enzimas secretadas, que permiten la degradación de proteínas, quitina y lípidos en el integumento del insecto (Ferron, Fargues, & Riba, 1991; Khachatourians, 1991). Una vez dentro del huésped, el hongo prolifera y libera blastosporas como indica la figura 1. El insecto muere por agotamiento de nutrientes en su hemolinfa y/o toxemia, provocada por las micotoxinas fúngicas (Khachatourians, 1991; Roberts,

1981). Sin embargo, la actividad antifúngica sobre los insectos objetivo no siempre es letal; entre los efectos sub-letales o secundarios se reporta en la literatura: la disminución del potencial reproductivo y de la fecundidad del hongo, así como de la fertilidad de las esporas (Feng, 1994).

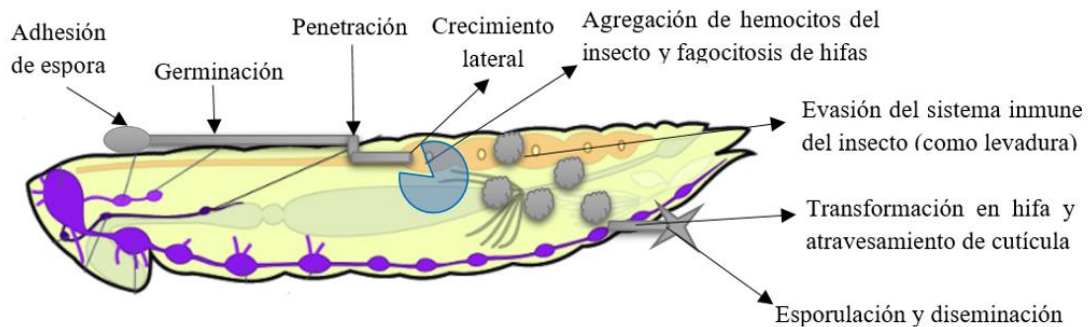


Figura 1. Mecanismo de acción de *Beauveria spp.*

FUENTE: modificado de (Téllez-jurado *et al.*, 2007, p. 74)

La clasificación de las especies del género *Beauveria* se encuentra constantemente en revisión, utilizando filogenias multigénicas. Se han delimitado seis clados bien sostenidos, siendo las especies más conocidas: *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. vermiconia*, *B. caledonica* (Rehner & Buckley, 2005). La especie más estudiada del género es *B. bassiana*; su capacidad de biocontrol de plagas de insectos ha sido evaluada para el desarrollo de bioinsumos agrícolas (Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, 2001), demostrándose que este hongo es competitivo en contraste con los insecticidas químicos en términos de infectividad (Feng, 1994). Por ende, es importante determinar el protocolo de obtención de cepas puras de este género de hongos, ya que su potencial biotecnológico es impresionante.

2.5.1. Recolección

Los hongos *Beauveria spp.* se encuentran con mayor frecuencia en suelos de tierras bajas con alto contenido orgánico y un pH neutro a alcalino. Para cada muestra de suelo se debe registrar el tipo de hábitat (bosque, Campo, pradera o seto), la altitud del sitio de muestreo, la posición GPS, el tipo de cubierta de vegetación y las

características básicas del suelo (pH, textura, entre otras) (Medo & Cagáñ, 2011; Medo, Michalko, Medová, & Cagáñ, 2016). Para su recolección, se toman muestras de suelo, las cuales se depositan en cajas de plástico y se conservan a 4 °C hasta su procesamiento (Medo & Cagáñ, 2011).

También se le puede aislar de insectos, ya que es entomopatógeno (Glare, Reay, Nelson, & Moore, 2008; Reay *et al.*, 2008). Para su recolección, se toman los cadáveres de insectos, se depositan en cajas de plástico y se conservan a 4 °C hasta su procesamiento (Medo & Cagáñ, 2011). Algunos de los insectos reportados en la literatura son: *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Leckie *et al.*, 2008), *Hylamorpha elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Glare, Jackson, & Cisternas, 1993), *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) (Posada & Vega, 2005), *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) (Gómez-Vidal *et al.*, 2009), *Ostrinia Furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Ying & Feng, 2004), entre otros.

Beauveria spp. puede encontrarse también como epibionte o endófito en más de 700 especies de plantas (Elliot *et al.*, 2000; J. F. White *et al.*, 2002); aunque las especies del género son pobres competidores en fuentes orgánicas en contraste con hongos saprófitos ubicuos (Hajek, 1997; Keller & Zimmerman, 1989). Se ha reportado su relación simbiótica con algas (Castrillo *et al.*, 2008), con la vid (*Vitis vinifera*) (Rondot & Reineke, 2016), el cacao (*Theobroma cacao*) (Posada & Vega, 2005), el café (*Coffea spp.*) (Posada, Aime, Peterson, Rehner, & Vega, 2007), el pino (*Pinus radiata*) (Brownbridge, Reay, Nelson, & Glare, 2012), el maíz (*Zea mays*) (Wagner & Lewis, 2000), el banano (*Musa spp.*) (Akello, Dubois, Coyne, & Kyamanywa, 2009), el espino blanco (*Crataegus Monogyna*), la ortiga (*Urtica dioica*) y varias Gramíneas (Poaceae), en particular la hierba del huerto *Dactylis glomerata* y la grama *Elytrigia repens* (Meyling & Eilenberg, 2006^a).

2.5.2. Aislamiento de cepas

Antes de procesar las muestras de suelo es necesario tamizarlas en un tamiz de 5mm, luego se disuelven en agua al 0,01 % y se agita a 200 rpm durante 20 minutos. La

solución obtenida se vierte sobre los platos de cultivo con agar pre-autoclavados a 120°C durante 20 minutos y se incuba a 24-28 °C durante al menos 14 días en oscuridad (Medo & Cagáñ, 2011). Para el caso de la vegetación, sólo se hace una impresión adaxial y abaxial de las hojas sobre agar y se hace conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) luego de dos semanas de incubación a 23 °C en oscuridad (Meyling & Eilenberg, 2006^a). Se da el mismo caso para cadáveres de insectos portadores del hongo (Lee, Kim, Skinner, Parker, & Kim, 2016).

Existe otro método para el aislamiento de estos hongos, empleando larvas susceptibles a *Beauveria spp.* como cebo, tal es el caso de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), aunque también se ha empleado gorgojos (Coleoptera: Curculionidae), moscas (Diptera: Anthomyiidae), escarabajos de la harina *Tribolium Destructor Uyttenb.* (Coleoptera: Tenebrionidae), barrenadores de corteza de pino *Acanthocinus Aedilis L.* (Coleoptera: Cerambycidae), escarabajos de tierra y escarabajos rove (Coleoptera: Carabidae y Staphylinidae). Para ello, se colocan los insectos vivos en cajas de Petri con muestra de suelo, se humedecen y se incuban a 18-25 °C en oscuridad, procurando invertir la caja diariamente durante los primeros 3 días y cada dos días durante el tiempo restante. Se toman las larvas muertas, asumiéndose que murieron por infección fúngica, se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio al 0,5% durante un minuto o con medicamento, se lavan tres veces con agua desmineralizada y se depositan en una cámara húmeda hasta esporulación del hongo. Posteriormente las larvas se siembran en agar como muestra la figura 2, y el micelio del hongo se repica hasta purificación de la cepa (Medo *et al.*, 2016; Meyling & Eilenberg, 2006b; Zimmermann, 1986). El método del Cebo, puede ser más efectivo si se mezcla con medios selectivos (Meyling, Lübeck, Buckley, Eilenberg, & Rehner, 2009).



Figura 2. Aislamiento de *Beauveria* a partir de insectos.

FUENTE: (Cajas-Suárez, 2012, p. 35)

Entre los medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento de estos hongos se encuentra: Agar Papa-Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Bidochka, Pfeifer, & Khachatourians, 1987^a); Agar de Dextrosa-Sabouraud (SDA, por sus siglas en inglés) (Medo *et al.*, 2016); SDA suplementado con Extracto de levadura (SDAY, por sus siglas en inglés) y antibióticos (penicilina, estreptomina y cloritetraciclina) (Akello *et al.*, 2009); y medio selectivo de Agar Glucosa-Peptona con antibióticos (estreptomina, tetraciclina, cicloheximida y dodina) (Strasser, Forer, & Schinner, 1997). El pH de los medios puede ser ajustado con KOH 1M (Medo & Cagáñ, 2011).

2.5.3. Identificación de especies

Los métodos tradicionales de identificación de las especies se basan en la observación de las características macroscópicas de la colonia fúngica (morfología, color...) y las características microscópicas de la esporas (tamaño, forma, color...), de acuerdo con claves taxonómicas reportadas en la literatura (Medo & Cagáñ, 2011).

El micelio de la fase asexual de las especies del género *Beauveria* se caracteriza por ser blanco con un reverso amarillento, tener textura algodonosa a polvorienta, y poseer conidióforos simples agrupados irregularmente o en grupos verticilados. En algunas

especies los conidióforos presentan forma de botella (Ramos Delgado, 2016). Morfológicamente, *B. bassiana* presenta hifas hialinas tabicadas de 2,5 a 25 μm de diámetro, de donde se desprenden los conidióforos simples raramente agrupados, según figura 3, los cuales sostienen los conidios, originados de formas simpodial o acrópeta. Las esporas son hialinas y esféricas, aunque a medida que disminuye la concentración de oxígeno en el medio se tornan ovaladas, recibiendo el nombre de blastósporas (Barron, 2001).

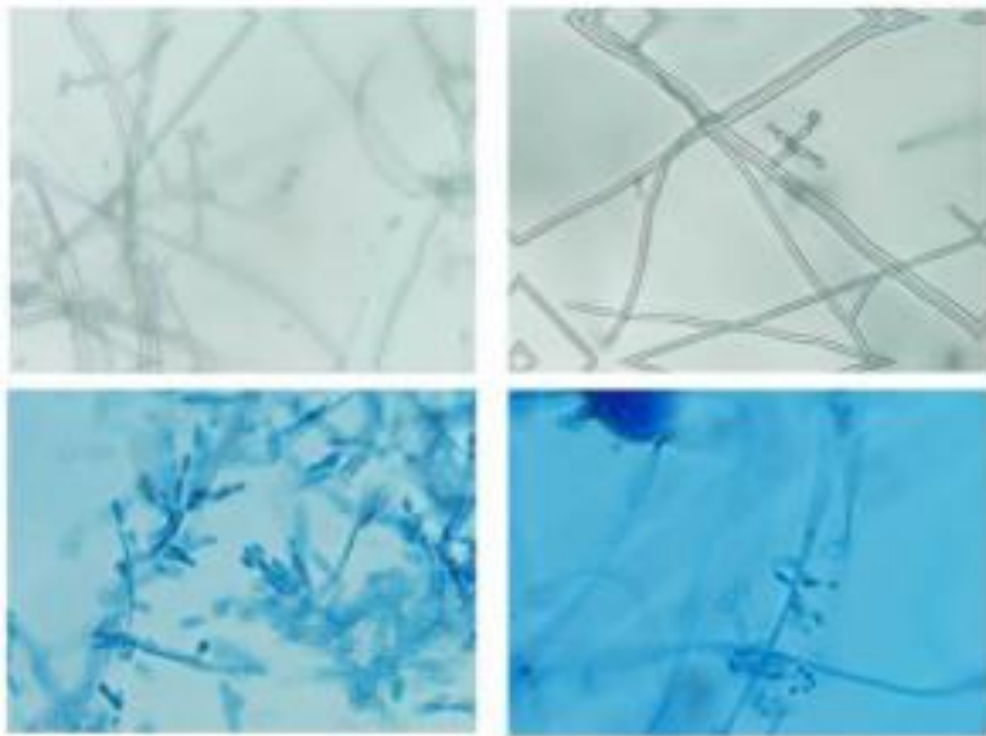


Figura 3. Estructuras microscópicas del hongo *B. bassiana*.

FUENTE: (Ramos Delgado, 2016, p. 68)

Para la identificación a nivel genómico, se toma una solución de esporas, la cual se amplifica mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y se secuencian con los respectivos cebadores. Las secuencias obtenidas se analizan, ensamblan, procesan y alinean empleando un software especializado. Las secuencias de haplotipos únicos adquiridos, así como las secuencias de referencia (Buscar en Genbank) se utilizan para el análisis filogenético (Medo *et al.*, 2016). Hasta el año 2018 se han reportado alrededor de 20 mil secuencias de ADN y ARN, 35

sondas y cebadores basados en la secuencia, más de 57 mil secuencias de proteínas, 343 conjuntos de secuencias de estudios filogenéticos y de población, entre otros (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2018).

Un alto nivel de diversidad genética se detecta comúnmente dentro de las poblaciones naturales de *Beauveria spp.* a nivel inter e intra-específico (Rehner & Buckley, 2005; Rehner *et al.*, 2006). Para distinguir adecuadamente entre las especies del género se emplean marcadores filogenéticos generales tales como el espaciador intergénico (ITS) o el factor de alargamiento 1- α , los cuales no son capaces de caracterizar esta diversidad en profundidad; por lo que se ha desarrollado en los últimos años el marcador Bloc, así como microsatélites, que permiten una mayor resolución de los aislamientos (Castrillo *et al.*, 2008; Coates, Hellmich, & Lewis, 2002; Hollingsworth, Lysy, & Matsumoto, 2011; Meyling & Eilenberg, 2006a).

2.5.4. Caracterización

La patogenicidad de este hongo se debe a su síntesis de proteínas degradantes de cutícula (Charnley & Leger, 1991), proteínas Bb70p (Khan *et al.*, 2016), lipasas (Leopold & Samšičáková, 1970), trehalasas (Liu, Ying, & Feng, 2011), proteasas (Shimizu, 1993), metaloproteasas, subtilisinas (Khachatourians, 1996), oxidoreductasas (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2016), quinasas (Luo *et al.*, 2012), quitinasas, hidrofobinas, bassiacridinas, citrocromos, catalasas, fosfatasa, entre otras enzimas (Valero-Jiménez, Wieggers, Zwaan, Koenraadt, & van Kan, 2016), que además de permitir la invasión del huésped cumplen funciones biológicas primordiales para el crecimiento y desarrollo de las hifas. Durante el metabolismo secundario se producen toxinas como beauvericinas (Leckie *et al.*, 2008), oosporeínas (Brownbridge *et al.*, 2012), ciclosporinas (Weiser, Matha, Zizka, & Jegorov, 1989), Bassianolidinas, eniáticas (Valero-Jiménez *et al.*, 2016) y destruxinas (Toegel, Salar-Behzadi, Horaczek-Clausen, & Viernstein, 2010), que también contribuyen a la patogenicidad del hongo.

2.5.5. Conservación de cepas

Para cepas de uso contante, el almacenamiento en medio sólido se efectúa por lo general a 24 °C en oscuridad; aunque la viabilidad empieza a perderse luego de una semana de almacenamiento. Para que las cepas conserven viabilidad es necesario subcultivar cada seis semanas, conservar a 4°C y hacer pruebas de infectividad cada seis meses (M. C. Rombach, Aguda, & Roberts, 1988; Wagner & Lewis, 2000).

Las esporas liofilizadas se pueden almacenar a 20 °C (Ying & Feng, 2004), mientras las soluciones de esporas en agua o glicerol al 10 % lo hacen a -80 °C (Kim, Kassa, Skinner, Hata, & Parker, 2011; Medo *et al.*, 2016; Posada & Vega, 2005). Las soluciones con glicerol puede suplementarse también con 0,05 % de Tween 80 (Pham, Kim, Kim, & Kim, 2009), fructosa, glucosa o sacarosa, que actúan como criopreservantes, ya que este hongo es criosensible (Toegel *et al.*, 2010). Taylor y Feng (1994) demostraron que la viabilidad de los conidios sumergidos almacenados a 4 °C es de 93,3 %; 87,3 %; y 35,3 % por un tiempo de almacenamiento de 8, 12 y 19 meses, respectivamente. Mientras que la viabilidad las blastosporas sumergidas presenta valores menores, correspondientes al 32,0, 29,3 y 4,8 %, bajo las mismas condiciones de almacenamiento.

Las esporas también pueden almacenarse a temperatura ambiente, siempre y cuando se empleen envases con atmósferas modificadas. Atmósferas con CO₂, N₂, H₂ o He pueden conservar la viabilidad hasta un 51 % a 50 °C; por otro lado, atmósferas con 20 % de CO₂ Y 80 % de N₂ permiten conservar la viabilidad de las esporas hasta un 80 % durante 150 días a 40 °C o 30 días a 50 °C, y hasta un 87 % durante 16 semanas a 25 °C, siempre y cuando se tenga una Actividad de Agua (A_w, por sus siglas en inglés) igual o menor a 0,032 (Faria, Hotchkiss, & Wraight, 2012).

Una de las formas para determinar la viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos es usar suspensiones fúngicas estandarizadas a concentraciones definidas, las cuales se dispersan en placas que contienen Agar Sabouraud o Agar Papa Dextrosa. Las placas se incuban a 24-26 ° C, con un fotoperiodo de 12 horas y

humedad relativa del 60-80%. Después de 24 horas el porcentaje de conidios germinados y no germinados se cuantificaron con un microscopio de luz (S. B. Alves, 1998). Un protocolo más específico fue elaborado por Oliveira, Pauli, Mascarin y Delalibera (2015).

2.6. Producción de biomasa fúngica

Existen métodos muy variados para la producción de conidios de hongos entomopatógenos, pudiendo ir desde lo simple a lo complejo según el medio de cultivo empleado para su producción y el grado de tecnificación del proceso. Muchos experimentos a escala laboratorio han sido llevados a cabo con el fin de determinar la composición del medio de cultivo y los parámetros óptimos para la producción de biomasa fúngica, evaluando a su vez, sustratos alternativos de bajo costo que mejoren la producción, la infección y almacenamiento de estos microorganismos.

Beauveria spp. se cultiva fácilmente por fermentación en estado sólido o líquido, siendo la segunda la que presenta la producción de conidios más rápida (B. Alves, Filho, & Roberts, 2003), aunque se considera que la conidiación depende de la naturaleza del aislado y de las condiciones fisiológicas particulares usadas (M. C. Rombach, 1989). La diferencia entre las dos fermentaciones radica en que en medio sólido se producen espontáneamente conidios aéreos por agotamiento de los nutrientes, mientras que en medio líquido se producen blastosporas como consecuencia de la fragmentación de las hifas por las fuerzas mecánicas de agitación (Bidochka *et al.*, 1987^a; Feng, 1994).

Las Blastosporas son más delicadas y de corta duración que las conidiosporas a causa de su fina pared, pero pueden ser igual o más virulentas (Bartlett & Jaronski, 1988; Hall, 1981; Pham *et al.*, 2009; P. Taylor & Feng, 1994). No obstante, las conidiosporas son más estables durante el secado post-fermentación ya que tienen una pared más gruesa (Yin, Chen, Chen, Guo, & Li, 1988b), por lo que son más empleadas para la producción de pesticidas agrícolas; sin embargo, deben ser separadas del sustrato para

la formulación del bioinsumo, lo que aumenta la dificultad del proceso (Lee *et al.*, 2016).

La Fermentación en Estado Sólido (FES) es sencilla y de bajo costo, debido al fácil acceso a las materias primas. Consta de cuatro fases de desarrollo: 1) inoculación del sustrato; 2) propagación del micelio; 3) agotamiento de nutrientes; 4) esporulación aérea. Se reportan tres tipos de contenedores para la producción de esporas: sacos de polipropileno, botellas de vidrio y bandejas (Lopes, 2008).

La Fermentación en Estado Líquido (FEL) emplea como su nombre lo dice, medios de cultivo líquidos de origen sintético o natural, en donde ocurre conidiación sumergida, la cual consta de cinco fases de desarrollo: (1) hinchazón y germinación de conidios; (2) formación de micelios y conidióforos; (3) ramificación del micelio y conidiación inicial; 4) conidiación masiva; (5) separación de conidios en cultivo líquido (Kononova, 1978). Pese a ser más rápida que la FES y permitir tanto un mejor control de parámetros de operación como una separación de esporas más sencilla, presenta mayores costos de producción y tiende a producir mayor proporción de blastosporas que de conidios sumergidos (García-Gutiérrez, González-Maldonado, Medrano-Roldán, & Solís-Soto, 2013).

Para aprovechar las ventajas de la FES y de la FEL, se ha incursionado en la producción de esporas de *Beauveria spp.* por fermentación bifásica, logrando producir en poco tiempo conidios sumergidos similares a los conidios aéreos en estabilidad y virulencia. En la primera etapa el micelio vegetativo se produce en condiciones sumergidas, mientras que en la segunda etapa el inóculo líquido se transfiere a un medio sólido para que ocurra la conidiación superficial del micelio (Feng, 1994; Hall & Papierok, 1982). Según Soper y Ward (1981), la fermentación bifásica permite que el hongo crezca en fermentadores hasta el final de la fase logarítmica obteniendo una producción máxima de biomasa micelial. Aunque este método requiere de gran cantidad de mano de obra, lo que hace más costosa su implementación (M. C. Rombach, 1989).

2.6.1. Preparación del inóculo

Las cepas de trabajo se cultivan por lo general en Agar Glucosa- Peptona de soya (Rondot & Reineke, 2016), Agar Papa-Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Bidochka *et al.*, 1987^a) o Agar de Dextrosa-Sabouraud (SDA, por sus siglas en inglés) (Medo *et al.*, 2016) o Agar Harina de Avena a 22-26 °C, alternando luz y oscuridad (Greenfield *et al.*, 2016). Para obtener el inóculo líquido, los conidios se cosechan vertiendo tween 80 al 0,02 % sobre las cajas de Petri y raspando suavemente con una varilla de vidrio la superficie de las colonias de *B. bassiana* de 8 días de edad (Pham *et al.*, 2009); luego se suspende en Solución de Ringer concentrada con 0,02% de Tween 80 (Rondot & Reineke, 2016), caldo estéril de levadura-glucosa (Leckie *et al.*, 2008) o caldo Dextrosa-Saboraud (Ying & Feng, 2004) y se deja incubando durante 6 días a 24-26 °C (Lee *et al.*, 2016). La concentración de conidios en la solución se mide con un hemocitómetro o una cámara de Neubauer.

2.6.2. Fermentación

Para la Fermentación en Estado Líquido (FEL), el inóculo se vierte en el medio de cultivo y se incuba por el tiempo correspondiente. Para medios líquidos, como caldo de glucosa y extracto de levadura, se reporta un tiempo de incubación de 4 a 5 días a temperatura ambiente en biorreactores con capacidad de 7 u 8 litros. Los micelios se cosechan mediante filtración al vacío a través de un tamiz de malla 18 (abertura de malla de 1 mm) o un embudo de Buchner hasta su posterior análisis (Leckie *et al.*, 2008).

La figura 4 muestra dos prototipos de biorreactores a escala laboratorio, donde (I) está conectado a una bomba de aire, por lo que la aireación es forzada, mientras que (II) no está conectado a ninguna fuente, por lo que la aireación es natural, permitiendo sólo el ingreso del aire necesario, lo que permite una menor contaminación del medio (Mata Astorga, 2008).

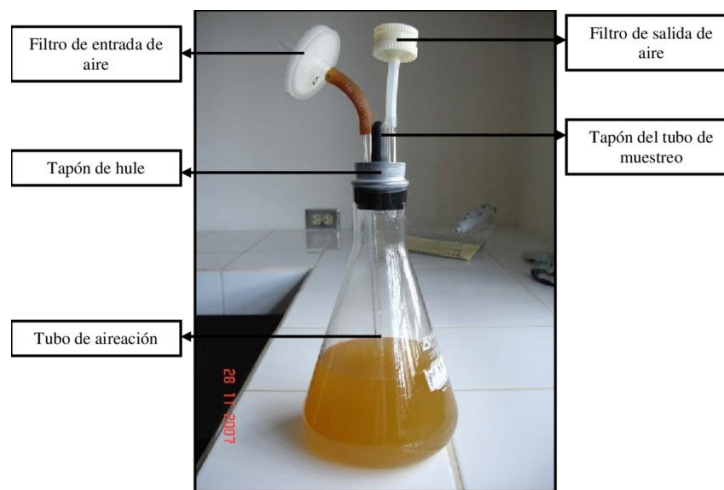


Figura 4. Fermentadores tipo I y II para la producción de *B. bassiana* por FEL

FUENTE: (Mata Astorga, 2008, p. 31-32)

Para la Fermentación en Estado Sólido (FES, por sus siglas en inglés), se siguen tres pasos como indica la figura 5. Primero, se esteriliza el sustrato a 121 °C por 45 minutos en bolsas de polipropileno. Se han reportado condiciones de esterilización de medios de cultivo a 120 °C por 20 minutos (Medo & Cagáñ, 2011; Meyling & Eilenberg, 2006^a); y de bioreactores a 248 °C, 200 rpm de agitación y un flujo de 4 L de aire comprimido por minuto de aireación durante 1 día (Leckie *et al.*, 2008). Una vez enfriado el medio de cultivo, se inocula con suspensión de esporas y se incuba a 24-26 °C durante 6-7 días, pudiendo alargarse hasta las dos semanas. Posteriormente, se seca el cultivo por ventilación a 34 °C durante 1 día y a temperatura ambiente durante otro día. Finalmente, los conidios se cosechan, separándose del sustrato con un tamiz vibratorio de 78 mesh y secándose durante un día más. Algunos autores humectan el

sustrato con una solución de ácido cítrico al 4 %, para para reducir la contaminación bacteriana (Feng, Pu, Ying, & Wang, 2004; Kim *et al.*, 2011).

Lee y colaboradores (2016) emplearon bolsas de polipropileno con perforaciones de 15 micras de diámetro, lo que les permitió posteriormente sumergir las bolsas incubadas en agua para lavar el sustrato con agitación y obtener una nueva solución de esporas con una concentración promedio de 1×10^6 conidios/ml, útil para biopreparados.

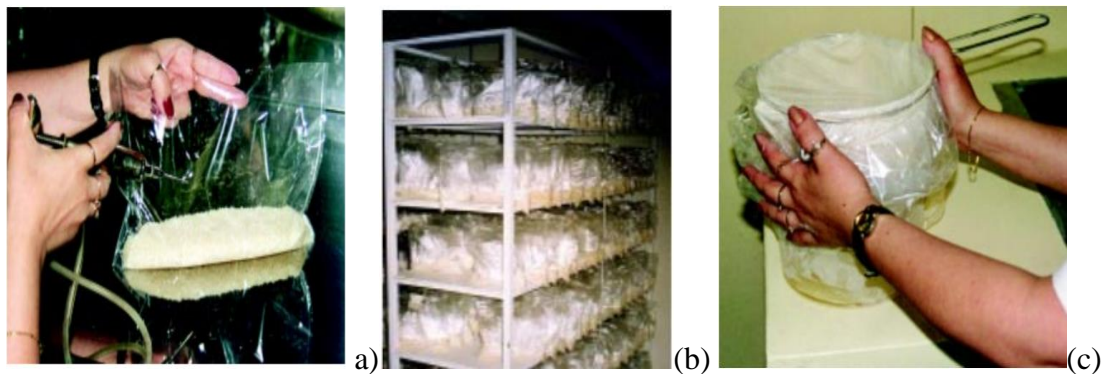


Figura 5. Producción de *B. bassiana* por FES: inoculación (a), incubación (b) y cosecha (c).

FUENTE: (Monzón, 2000, p. 20-22)

2.7. Parámetros de operación

2.7.1. Composición del medio

La composición del medio esta inherentemente relacionada con la cantidad y calidad del hongo producido (Kassa *et al.*, 2008). La proporción C:N óptima es de 22,4 y el mejor medio para fermentación líquida descrito se conforma de una solución con 3% de harina de maíz, 2% de polvo de maíz y 2% de salvado de arroz (Pham *et al.*, 2009). Alguno de los sustratos utilizados para el crecimiento de *B. bassiana* son generalmente productos vegetales ricos en almidón como granos y polvo de mijo italiano (*Setaria itálica*) (Kim *et al.*, 2011), salvado de trigo (M. C. Rombach *et al.*, 1988), arroz (Feng, 1994), patatas, avena, maíz y fréjol. De estos, el arroz cocido es uno de los medios más

comúnmente utilizados para la producción de *B. bassiana* a gran escala (Leite, L. G., Batista Filho, A., Almeida, J. D., & Alves, 2003). El lactosuero también ha sido empleado por algunos autores, gracias a su contenido de lactosa y proteínas, como fuente de azúcar y nitrógeno, correspondientemente (Kassa *et al.*, 2008). Igualmente, los gránulos de alginato de sodio con salvado de trigo también han sido empleados para la inmovilización de las esporas (Knudsen, Johnson, & Eschen, 1990; Marques, Alves, & Marques, 1999).

Está demostrado que la composición del medio líquido puede determinar la producción de conidios (Feng, 1994). Yin y colaboradores (1988^a) indujeron la producción de conidios sumergidos al emplear un medio líquido conformado con un 2% de jarabe de maíz, 3% de sacarosa y diversas sales basales. La conidiación sumergida está relacionada con la naturaleza de la fuente de carbono y la presencia de nitrato como fuente de nitrógeno, por ejemplo, KNO_3 y NaNO_3 (Kononova, 1978; Schamne, 2010; Thomas, Khachatourians, & Ingledeew, 1987); sin embargo, el uso de NH_4NO_3 induce la producción de blastosporas en fermentadores (C. J. Chen *et al.*, 1990). Por otro lado, la adición de fosfato reduce significativamente la producción de conidios, mientras la de quitina presenta un efecto contrario (Hegedus, Bidochka, & Khachatourians, 1990) Bidochka, Pfeifer y Khachatourians (1987b) estudiaron el crecimiento de *B. Bassiana* en cultivo líquido probando diferentes medios: 0,2 % de extracto de levadura - 1 % de peptona - 2 % de glucosa; 1 % de peptona - 2 % de glucosa; 1 % de peptona; 2 % de glucosa. Encontraron que la producción de blastosporas se da en todos los medios líquidos a excepción del compuesto únicamente por glucosa. En peptona-glucosa, el rendimiento de blastosporas fue cuatro veces mayor que en el extracto de levadura-peptona-glucosa. Sin embargo, la producción más alta de biomasa surgió al usar el levadura-peptona-glucosa.

La sustitución de glucosa por otra fuente de carbono simple como citrato, lactosa, sorbitol, almidón, fructosa o glicerol disminuye el rendimiento de conidios sumergidos y/o aumenta la proporción de blastosporas (Thomas *et al.*, 1987), además, disminuye la adhesión de los conidios aéreos; aunque la combinación de extracto de levadura y sacarosa o maltosa, induce una mayor conidiación (M. C. ubmerge. Rombach, 1989).

Por otro lado, la presencia de N-acetilglucosamina promueve la adhesión conidial, mientras los detergentes le inhiben (Holder & Keyhani, 2005). En consecuencia, los tensoactivos como aceite de ricino, éter lauril de polioxietileno, tween 80, tween 20, entre otros, se emplean para disminuir la adhesión de los propágulos al sustrato y puedan fácilmente disolverse en la solución acuosa en que se sumerjan. El tensoactivo más eficaz es Silwet L-77 (Lee *et al.*, 2016). La adición de sodio y potasio aparte de servir como fuente de nutrientes, sirve también como para regular la presión osmótica (B. Alves *et al.*, 2003).

2.7.2. Temperatura

Estudios han demostrado que este hongo puede crecer adecuadamente en un rango de temperatura de 20-25 °C (Hajek, 1997), aunque un estudio demuestra que la temperatura óptima de crecimiento micelial es a 25-27 °C (Pham *et al.*, 2009).

2.7.3. Humedad

Las conidiosporas germinan en un medio con alta humedad (Couch & Ignoffo, 1981), que puede variar entre el 30 al 80%, dependiendo de la especie. No obstante, una alta humedad causa disminución de la porosidad del sustrato, baja difusión de oxígeno y mayor actividad microbiana. Por el contrario, una baja humedad conduce a un limitado crecimiento del hongo y una baja biodisponibilidad del sustrato (Cruz-Barrera, 2014).

2.7.4. Iluminación

Para la inducción de los conidios aéreos en medios sólidos se hacen crecer los hongos en condiciones de oscuridad (Rondot & Reineke, 2016; Wagner & Lewis, 2000), aunque algunos autores emplean un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Ownley, Gwinn, & Vega, 2010); o 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Greenfield *et al.*, 2016).

2.7.5. pH

Bajos pH disminuyen la adhesión conidial, aunque no de manera drástica (Holder & Keyhani, 2005). El óptimo pH inicial para la producción de esporas es 5,2 (Pham *et al.*, 2009).

2.7.6. Agitación

Las fuerzas mecánicas de la agitación fragmentan los micelios y promueven la formación de blastosporas (Bartlett & Jaronski, 1988; Hall, 1981; Pham *et al.*, 2009). Se reporta que la frecuencia de agitación de medios líquidos que permite la mayor producción de esporas es de 200 rpm (Pham *et al.*, 2009).

2.7.7. Afinidad de los propágulos

Beauveria spp. produce al menos tres propágulos unicelulares distintos: conidios aéreos, células vegetativas denominadas blastosporas y conidios sumergidos; que se pueden aislar de placas de agar, de cultivos líquidos ricos en nutrientes y de cultivos sumergidos bajo condiciones de limitación de nutrientes, respectivamente. Los conidios aéreos se adhieren mal a las superficies débilmente polares y rápidamente a las superficies hidrófobas e hidrófilas. Por el contrario, las blastosporas se unen mal a las superficies hidrófobas, formando pequeños agregados; pero se unen a las superficies hidrófilas y polares débiles, con la diferencia de que con esta última requiere un mayor tiempo de incubación para unirse. Por su parte, los conidios sumergidos muestran una especificidad de unión más amplia a superficies hidrofóbicas, débilmente polares e hidrofílicas (Holder & Keyhani, 2005).

2.8. Rendimiento

Las tasas de germinación se calculan mediante un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Goldman & Green, 2008). Una de las formas para determinar la viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos es usar suspensiones

fúngicas estandarizadas a concentraciones definidas, las cuales se dispersan en placas que contienen Agar Sabouraud o Agar Papa Dextrosa. Las placas se incuban a 24-26 ° C, con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa del 60-80%. Después de 24 horas el porcentaje de conidios germinadas y no germinadas se cuantificaron con un microscopio de luz (S. B. Alves, 1998).

La determinación del rendimiento de cultivos sólidos es complicada, ya que los hongos están íntimamente ligados a la matriz sólida en la que se desarrollan, lo que dificulta la medición de la biomasa producida. Por el contrario, en el cultivo sumergido, la biomasa puede separarse y cuantificarse más fácilmente por diferencial de peso seco. Bajo este contexto, se han realizado estudios que permitan estimar de forma indirecta la cantidad de biomasa generada mediante la medición de otros componentes producidos proporcionalmente con el crecimiento celular, tales como la glucosamina, los azúcares totales y el ergosterol. Los resultados obtenidos por Desgranges, Vergoignan, Georges y Durand (Desgranges, Vergoignan, Georges, & Durand, 1991) muestran que las mediciones de glucosamina son un buen indicador del desarrollo de la biomasa fúngica. Sin embargo, este indicador de biomasa sólo puede ser utilizado para comparar diferentes medios que tienen los mismos constituyentes. Incluso si las relaciones C/N son diferentes.

2.9. Banco de recursos genéticos microbiano (BRGM)

2.9.1. Definición

Los Bancos de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) son instituciones capaces de salvaguardar, mantener y distribuir cepas microbianas autenticadas, su ADN y los datos asociados de una manera controlada para la investigación y el desarrollo comercial (McCluskey, 2017; Overmann, 2015). Estos BRGM deben proporcionar información relevante en cuanto a la biología de la especie, inventario de individuos, accesibilidad, aplicaciones, entre otros datos (Medina, Velasco, & Cruz, 2006). Por otro lado, apoyan a los depositantes de recursos microbianos para enfrentar nuevos

desafíos legales luego de la implementación del Protocolo de Nagoya (Overmann, 2015).

Los BRGM permiten la conservación *ex situ* de las especies ya que brindan un seguro cuando las especies desaparecen en su ambiente natural, y proporcionan un suministro oportuno de materiales para investigación y para reposición de las variedades locales relegadas (Valencia, Lobo, & Ligarreto, 2010). Según Herrera & Rodríguez (2004), la conservación *ex situ* “constituye un proceso que implica tanto el almacenamiento de los recursos genéticos en bancos de germoplasma, como el establecimiento de colecciones de campo y manejo de especies en condiciones especiales de crecimiento” (p. 187).

Las colecciones biológicas son bancos de datos que proveen de información básica sobre la diversidad biológica en un lugar y tiempo determinado, por lo que permite conocer tanto la biodiversidad actual como la pasada (Simmons & Muñoz-Saba, 2005).

Actualmente, existe a nivel internacional la Federación Mundial para Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés), que es una comisión Multidisciplinaria de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (IUBS) y de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS), encargada de la recolección, autenticación, mantenimiento y distribución de cultivos de microorganismos y células cultivadas. Esta federación cuenta con una base de datos internacional sobre recursos culturales en todo el mundo, llamada World Data Center for Microorganisms (WDCM, <http://www.wdcm.org/>).

El Fungal Genetics Stock Centre (FGSC, <http://www.fgsc.net/>) es el repositorio público más grande de hongos y levaduras genéticamente caracterizados y autorizados para aplicaciones en genética, biología celular, medicina y agricultura.

Según Overmann (2015) “Las cepas aisladas constituyen la base de la sistemática microbiana y de numerosas aplicaciones en biotecnología, farmacología, agronomía y salud pública”.

2.10. Marco Legal

La diversidad biológica está actualmente protegida por diferentes instrumentos jurídicos tanto a nivel internacional como nacional, conocer ambos es de gran importancia ya que desde el momento en que un Estado ratifica un tratado internacional, éste pasa a tener fuerza de ley en su propio territorio (Sánchez, 2002).

A nivel internacional se subraya la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo (la “Cumbre de la Tierra”), realizada en Río de Janeiro (1992), la cual aborda de manera exhaustiva la diversidad biológica y tiene como objetivo su conservación, uso sostenible y división equitativa de utilidades obtenida por explotación comercial. A partir de aquí surgen el Programa 21, la Declaración de Río sobre Medio Ambiente y Desarrollo, el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), y el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos (United Nations, 2017). Para el cumplimiento del protocolo se establecieron Puntos Focales Nacionales (PFN) y las Autoridades Nacionales Competentes (CNA) (Secretaría Del Convenio Sobre la Diversidad, 2011).

Por otro lado, la Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones (CAN) establece principios generales y normas para el acceso a los recursos genéticos y la utilización de los mismos, y la Decisión 523 de la CAN, titulada “Estrategia Regional de Biodiversidad para los Países Andinos Tropicales” abarca la conservación de la biodiversidad y el uso sostenible de los recursos genéticos (Acción Ecológica, 2013). El Plan de Acción Mundial (PAM) para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación

(RFAA) prioriza la conservación de la diversidad genética de los recursos que permitan afrontar la crisis alimentaria.

A nivel nacional, la carta magna ecuatoriana, declara en el capítulo segundo que es de interés público la conservación del ambiente y la biodiversidad, la mitigación del daño ambiental, la restauración de los espacios naturales degradados y la integridad del patrimonio genético del país (Asamblea Nacional, 2008). En consecuencia, el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) lidera el Banco Nacional de Germoplasma del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), con el objetivo de regular el uso de la biodiversidad vegetal por parte de agricultores, fitomejoradores, agroindustriales y científicos (DENAREF, 2011; Tapia, Zambrano, y Montero, 2008).

Actualmente, el Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) está creando el primer BRGM nacional, con el objetivo de promover la conservación y uso sostenible de la biodiversidad microbiana endógena. El proyecto se enmarca dentro del Plan de gobierno actual y la Constitución Política Nacional (Pineda-insuasti, 2016).

CAPÍTULO III

3. Estudio experimental

3.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Beauveria spp.*

El experimento tiene como objetivo aislar, identificar y caracterizar la cepa nativa de *Beauveria spp.*, para su conservación en un Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) con fines industriales.

3.2. Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) en convenio con el Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM), localizado en la Ciudad de Ibarra a 2241 msnm con una temperatura promedio de 18 °C.

3.2.1. Reactivos

Se empleó los medios de cultivo Agar antibiótico, Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA) de la marca FUNGI PERFECTI®, los cuales se prepararon siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

3.2.2. Medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo Agar Antibiótico de la marca FUNGI PERFECTI®, el cual fue preparado siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

3.2.3. Equipos

Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA con filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1, un termociclador Analitek C1000 Touch y una cámara de electroforesis Thermo Scientific™ P81.

3.2.4. Material biológico

Beauveria spp. se aisló de cafetales debido a que es el principal antagonista de la broca, plaga del café, y su ubicuidad le permite adaptarse a las mismas condiciones de cultivo que ella (Cruz-Barrera, 2014).

Las muestras de suelo y de granos de café arábica infestados por hongos se recolectaron en la Provincia de Imbabura, Cantón Cotacachi, Parroquia Apuela, Sector pueblo viejo, en una plantación con las siguientes coordenadas UTM WGS84 (GPS MAGELLAN 550): 17S Este 777252,87 Norte 10041385,16, según figura 6. La zona estaba a una altitud de 1647 msnm, con una temperatura promedio de 18 °C y una precipitación media de aproximadamente 1400 milímetros por año. Los muestreos fueron hechos en forma de zig-zag cerca de las raíces de la planta de café (ver figura 7), a una profundidad de 20 cm, conforme con Cubillos, Goretti y Lizcano (2014).



Figura 6. Ubicación geográfica de la zona de recolección de muestras.

FUENTE: el autor



Figura 7. Recolección de muestras de suelo.

FUENTE: el autor

3.2.5. Aislamiento

Se depositó 1 g de suelo en cada caja de Petri con agar antibiótico y se incubó durante 7 días a 22 °C. Las cepas de *Beauveria spp.* fueron purificadas mediante la técnica de repiques sucesivos en agar PDA (ver figura 8), teniendo en cuenta las claves taxonómicas de Humber (1997). Las cepas se codificaron como ceba BB-30u y ceba BB-20u, y se conservaron a una temperatura entre 2 a 4 ° C en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del CEBA. Las cepas de trabajo se prepararon por transferencia directa de micelio de las cepas madre a tubos de ensayo con medio nutritivo e incubación a 22 °C durante 7 días.

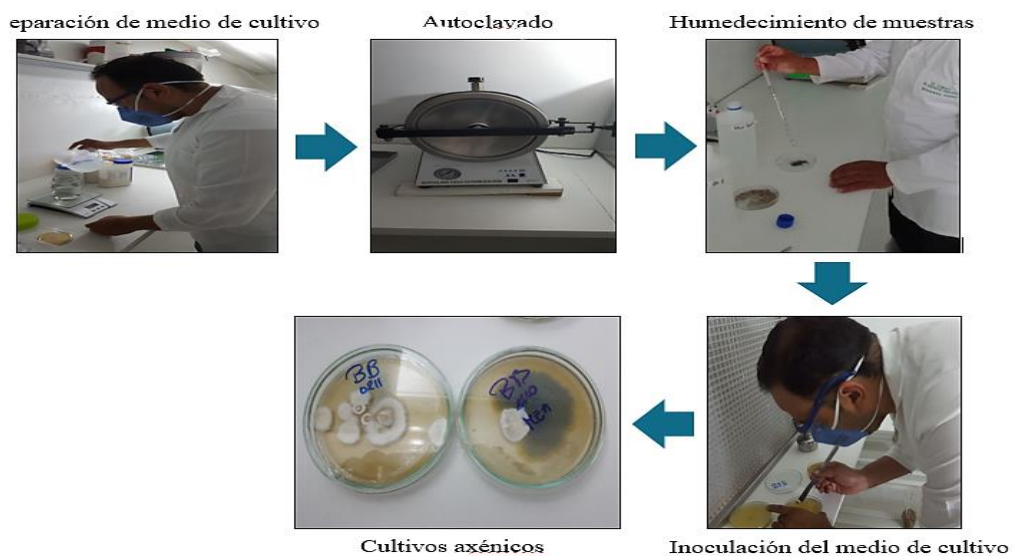


Figura 8. Proceso de aislamiento de *Beauveria spp.*

FUENTE: el autor

3.2.6. Identificación molecular

Fue realizada por el laboratorio especializado IDGEN (<http://idgen-ecuador.com/>) de la ciudad de Quito (Ecuador), siguiendo metodologías privadas y confidenciales, por lo que algunos detalles del protocolo de identificación no pueden ser especificados en este documento.

La identificación molecular consistió en la purificación de la cepa, extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y contraste de resultados con bases de datos.

Para la extracción de ADN se tomó micelio procedente de la colonia congruente de *Beauveria spp.*, codificada como H001, se efectuó el rompimiento celular mecánico (bead beating) y químico (buffer de lisis), y se siguió el método de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989), con adición de ARNasa para eliminar el ARN residual (X. Z. Fan *et al.*, 2014) (...ver anexo 1...). El ADN obtenido se diluyó en buffer TE 1x hasta una concentración en el rango de 15 a 30 ng/μL para descartar procesos inhibitorios de la PCR debido a una elevada concentración de ADN.

La verificación de la calidad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1%, empleando un marcador de bajo peso molecular para determinar la concentración de ADN en la muestra. Los resultados se confirmaron con un nanodrop. La amplificación del ADN se hizo mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), empleando los cebadores (primers) ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'), que son específicos para hongos (Gardes & Bruns, 1993; D. L. Taylor & McCormick, 2008; T. White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990), y el siguiente protocolo de termociclado, desarrollado por IDGEN: 95 °C por 3 min; 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 45 s y 72 °C por 1 min 30 s; 72 °C por 7 min; y 4 °C en espera. Como control positivo se empleó un tubo que contiene ADN de una muestra amplificada de *B. bassiana* y cuyo patrón de bandas es conocido; mientras que como control negativo se usó un tubo al que se le agregaron todos los reactivos utilizados en el PCR, excepto

ADN (Espinosa, 2007). La PCR fue ensamblada bajo cabina de bioseguridad con un flujo positivo, y en un termo bloque a -5 °C. La observación de amplicones se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, comparando con marcadores de 1 Kb (1 000 pb).

La secuenciación de amplicones se realizó por el Método de Sanger, Nicklen y Coulson (1977), mientras que el ensamblaje y depuración de las secuencias obtenidas se efectuó con el programa bioinformático GENEIOUS. La comparación de las secuencias de nucleótidos ensambladas se hizo con la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/?term=beauveria>) mediante la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.7. Análisis bromatológico

Fue realizada por el laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), estación experimental Santa Catalina. El Análisis Proximal (Bromatológico) se realizó por el método MO-LSAIA-01, tomando como referencia el método U. Florida 1970; mientras la cuantificación de los minerales más importantes se realizó por el método MO-LSAIA-03, tomando como referencia el método U. Florida 1980. La unidad experimental consistió en 2Kg de la cepa ceba BB-30u de *Beauveria spp*, perteneciente al BRGM del CEBA.

3.3. Protocolo de conservación para la especie *Beauveria bassiana* por liofilización.

El objetivo de este experimento es desarrollar un protocolo para la conservación de la cepa nativa del hongo de *Beauveria bassiana* utilizando la liofilización.

3.3.1. Materiales y métodos

3.3.1.1. Medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) de la marca FUNGI PERFECTI®, el cual fue preparado siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

3.3.1.2. Cepa

Se empleó la cepa ceba BB-30u de *B. bassiana*, perteneciente al Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA); la cual fue aislada, caracterizada e identificada en el acápite anterior.

3.3.1.3. Equipos

Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1, y un equipo liofilizador de bandejas marca VirTis wizard 2.0 adVantaje Plus (ver figura 9), perteneciente a la Universidad Técnica del Norte (UTN) (...ver ficha técnica en anexo 2...).



Figura 9. Equipo liofilizador VirTis

FUENTE: el autor

3.4.1.4. Preparación de cepas de trabajo

El medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) se preparó siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000), se vertieron en tubos de ensayo de 10 ml y se dejaron solidificar a temperatura ambiente en posición inclinada. Luego se inocularon con plugs de micelio de la cepa de reserva Ceba BB-30u, se taparon con tapones de algodón y se incubaron durante 7 días a 22 °C. La figura 10 muestra las cepas de trabajo de *Beauveria spp.* antes de la liofilización.



Figura 10. Cepas de trabajo de *Beauveria spp.* antes de la liofilización

FUENTE: el autor

3.4.1.5. Liofilización

Las cepas de trabajo fueron congeladas mediante un descenso gradual de temperatura en siete pasos desde 15 °C hasta -40 °C durante 14 horas a 200 atm de presión, y posteriormente secadas mediante un ascenso progresivo de temperatura en nueve pasos desde -40 °C hasta 40 °C durante 18 horas a 300 atm de presión. Los parámetros de operación detallados se consignan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1.*Tratamiento térmico durante la liofilización*

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Paso 1	15	120
Paso 2	0	120
Paso 3	-10	120
Paso 4	-15	120
Paso 5	-20	120
Paso 6	-30	120
Paso 7	-40	120

FUENTE: el autor

Tabla 2.*Secado primario durante la liofilización*

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Paso 1	-40	120
Paso 2	-30	120
Paso 3	-20	120
Paso 4	-10	120
Paso 5	0	120
Paso 6	10	120
Paso 7	20	120
Paso 8	30	120
Paso 9	40	120

FUENTE: el autor

3.4.1.6. Almacenamiento de cepas liofilizadas

Los tubos de ensayo o ampolletas con los cultivos liofilizados fueron sellados al vacío porque la presencia de oxígeno promueve pérdida de viabilidad (Homolka, 2014).

Luego fueron rotulados como Ceba-IIE-BB-010116, almacenados en oscuridad y conservados a una temperatura de aproximadamente 24 °C en el BRGM del CEBA. Para conservar la viabilidad de las cepas se evitó la congelación, de acuerdo con la Colección Española de Cultivos Tipo (Escandino, 2017). La viabilidad de las cepas se midió experimentalmente la velocidad de crecimiento de las colonias luego de la liofilización.

3.4. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Beauveria bassiana*

Este experimento tiene como objetivo seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de la cepa nativa del hongo *Beauveria bassiana* mediante la tasa de crecimiento radial. Se utilizó la metodología propuesta por Pineda *et al.* (2015).

3.4.1. Materiales y métodos

3.4.1.1. Medio de cultivo

Se emplearon los medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) y Agar Extracto de Malta (MEA, por sus siglas en inglés) de la marca FUNGI PERFECTI®, los cuales se prepararon siguiendo la técnica descrita por Stamets (2000).

3.4.1.2. Cepa

Se utilizó la cepa de *Beauveria bassiana* CEBA-IIE-BB-010116, proveniente del BRGM del CEBA.

3.4.1.3. Equipo

Se empleó una cámara de flujo laminar diseñada por el CEBA a partir de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) H14 EN-1822-1.

3.4.2. Medición de velocidad de crecimiento

La cepa de reserva CEBA BB-30u liofilizada fue suspendida en 1ml de agua destilada estéril e hidratada durante 30 min para disolver las esporas, luego se llevó a volumen de 10 ml y se realizó el conteo en cámara de Neubauer. A partir del total de esporas contabilizadas, se determinó el volumen necesario de solución para obtener 10.000 esporas/ml en 10 ml de agua estéril en un nuevo tubo de ensayo. Se tomó 1ml de la solución final, se inoculó una caja de Petri con PDA y se incubó durante 6 días a 22 °C. Se rotuló la cepa de trabajo como CEBA-IIE-BB-010116 (Echeverría Beirute, 2006; Puerto et al., 2009).

Cajas de Petri que contenían los medios de cultivo en estudio (PDA y MEA) fueron inoculadas con plugs o tacos de micelio de la cepa de trabajo CEBA-IIE-BB-010116 e incubadas a 22 °C durante 6 días.

La ecuación (1) permitió calcular la velocidad de crecimiento como el cociente entre el diámetro de la colonia y el tiempo de incubación (Pineda, Soto, Santiago, Ponce, & Reyes, 2015). El diámetro fue medido con cinta métrica.

$$V\left(\frac{\text{mm}}{\text{d}}\right) = x(\text{mm})/t(\text{d}) \quad \text{Eq. 1}$$

Donde;

V = Velocidad de crecimiento radial (mm/d)

X = diámetro de la colonia (mm)

t= Tiempo de incubación (d)

3.4.3. Diseño experimental

Se realizó un Diseño Factor Categórico Individual completamente aleatorizado, con 6 réplicas por tratamiento, para un total de 12 corridas experimentales. Como factor de estudio se seleccionó el medio de cultivo (MEA y PDA), como variable de respuesta

la velocidad de crecimiento radial y como factor de ruido el nivel de luz. Los parámetros de operación fueron la temperatura y el tiempo, que se mantuvieron constantes a 22°C y 6 días de incubación.

3.4.4. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico se realizó empleando el software estadístico STATGRAPHIS®, Centurion XV, versión 15.2.05. Se realizó un Análisis De Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) para evaluar el efecto de los medios de cultivo en la velocidad de crecimiento radial de *B. bassiana*; la prueba se efectuó con un nivel de confianza del 95%, un bloque de estudio y 10 grados de libertad para el error, tomando como Hipótesis nula (H_0) que la velocidad media de crecimiento de los distintos medios de cultivo son iguales y como Hipótesis alternativa (H_a) que al menos una es diferente.

Previamente, se verificaron los supuestos de la estadística paramétrica más importantes: normalidad y homocedasticidad (homogeneidad de varianzas). La distribución normal de los residuales se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk, con un nivel de confianza del 95%, tomando como H_0 que la muestra proviene de una población con distribución normal y como H_a lo contrario. Para apoyar la afirmación anterior se realizó la prueba de Jarque-Bera, con un nivel de confianza del 95%, empleando como H_0 que la muestra tiene la asimetría y la curtosis de una distribución normal y como H_a lo contrario. La homocedasticidad de los datos se verificó con la prueba de Levene, con un nivel de confianza del 95%, empleando como H_0 que la muestra proviene de una población con igualdad de varianzas entre los grupos y como H_a lo contrario.

3.5. Catálogo de cepas puras de *Beauveria bassiana*

El objetivo de este acápite es una herramienta que brinda a estudiantes e investigadores un fácil manejo de las cepas, puesto que proporciona información específica para el uso de las cepas nativas.

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Beauveria* spp.

4.1.1. Resultados

4.1.1.1. Aislamiento

La figura 12 muestra las cepas puras de *B. bassiana* aisladas de suelo de cafetal. Las colonias de *B. bassiana* presentaron una apariencia blanca algodonosa al inicio de la incubación, que con el tiempo se tornó de color crema y textura polvorienta con algunos coremios blancos, como muestra en la figura 11. El reverso presentó un color amarillo ligero. Se coincidió con las observaciones de Echeverría Beirute (2006) y de Cajas-Suárez (2012).



Figura 11. Cepas puras de *Beauveria. bassiana*

FUENTE: el autor, 2018

4.1.1.2. Identificación

La amplificación de los fragmentos ITS 1 y 4 mediante PCR convencional generó un fragmento de 600 pares de bases (pb). El resultado de la visualización del amplicón por electroforesis se muestra en la figura 12, donde M es el marcador de peso molecular, C+ es el control positivo y C- es el control negativo.

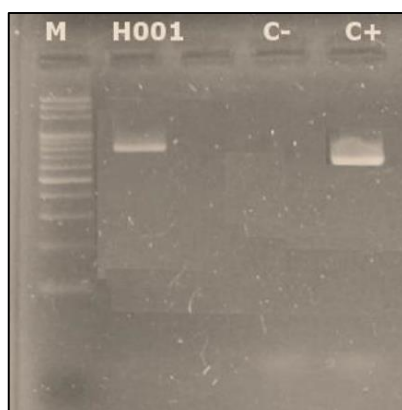


Figura 12. Amplicón del fragmento ITS de la muestra *B. bassiana* (H001) visualizado en gel de Agarosa 1%

FUENTE: IDGEN, 2018

El ADN lineal de H001 presenta una longitud de 537 pb, calidad del 99,4 % y al contrastarse con la secuencia de nucleótidos descrita en la accesión número KY471654.1 de la base de datos de GenBank muestra identidad del 100 % con *B. bassiana* (GenBank, 2017). La clasificación taxonómica de la cepa obtenida se detalla en la tabla 4:

4.1.1.3. Análisis bromatológico

En la tabla 3 y 4 se muestran los resultados del análisis químico, donde los datos bromatológicos se expresan en base húmeda y los minerales en base seca:

Tabla 3.*Resultados del análisis bromatológico de B. bassiana.*

Análisis proximal	
Humedad (%)	49,46
Cenizas (%)	1,86
Extracto Etéreo (%)	1,64
Proteínas (%)	16,74
Fibra (%)	3,02
Extracto Libre de Nitrógeno (%)	76,74

FUENTE: INIAP, 2018

Tabla 4.*Resultados del análisis de minerales de B. bassiana.*

Análisis proximal	
Ca (%)	0,22
P (%)	0,51
Mg (%)	0,17
K (%)	0,21
Na (%)	0,01
Cu (ppm)	2,00
Fe (ppm)	56,00
Mn (ppm)	32,00
Zn (ppm)	26,00

FUENTE: INIAP, 2018

4.2.1. Discusiones

4.2.1.1. Aislamiento

El aislamiento de hongos entomopatógenos se logra más comúnmente mediante la inoculación directa de diversos medios de cultivo con conidios desprendidos de cadáveres de insectos objetivo; no obstante, los métodos de enchapado con muestras de suelo son más deseables cuando no se conoce con precisión la especie a aislar (Hajek, Papierok, & Eilenberg, 2012). Además, éstos hongos son frágiles y relativamente exigentes, por lo que se requieren metodologías cuidadosas y medios de cultivo selectivos para su aislamiento y crecimiento (Hu, Chen, Ye, & Hu, 2018).

En este trabajo se empleó para el aislamiento y purificación de *Beauveria spp.* a partir de muestras de suelo, los medios de cultivo Agar Saboraud y Agar Papa Dextrosa, respectivamente. Galarza (2011) y Cubillos *et al.* (2014) emplearon también estos medios de cultivo para aislar y purificar hongos entomopatógenos. En otras investigaciones, se reporta el uso de medios de cultivo más selectivos a base de cloruro de cobre, cristal violeta y benzoato de sodio (Archuleta-Torres *et al.*, 2012); infusión de avena, cristal violeta, dodina y clortetraciclina (Garrido-Jurado *et al.*, 2015); PDA más peptona (Ramos Delgado, 2016); Agar Papa Sacarosa (PSA, por sus siglas en inglés) (García, Villamizar, Torres, & Cotes, 2006); PDA más oxitetraciclina (Echeverría Beirute, 2006).

El Agar Dextrosa Sabouraud (DSA, por sus siglas en inglés) es el medio actual de elección para la detección y el aislamiento de hongos (Goettel & Inglis, 1997), aunque según Smithee *et al.* (2014), no cumple los requerimientos nutricionales óptimos para algunos hongos y puede permitir el crecimiento de algunas bacterias que posteriormente pueden inhibir el crecimiento fúngico. Pese a que en este trabajo se empleó Agar Saboraud no se presentaron problemas de contaminación por bacterias y el aislamiento fue efectivo, lo que se comprobó con la identificación genética.

4.2.1.2. Identificación

Los estudios moleculares se consideran herramientas eficaces para determinar la relación inter e intragenética en especies de basidiomicetos, corroborando los resultados obtenidos mediante métodos convencionales (morfológicos, fisiológicos y bioquímicos) (Tao, Liu, & Xu, 2011).

Se debe garantizar la correcta identificación del hongo para evitar la pérdida de tiempo y presupuesto, la publicación de resultados erróneos, la entrega imprudente de microorganismos patógenos que pongan en riesgo la salud de los manipuladores, entre otras consecuencias (González & Jiménez, 2014).

El análisis de secuencias de Espaciadores Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés) es muy importante en la identificación de hongos y en los estudios de relación de parentesco entre especies o taxones en general, en el nivel de género o por debajo de éste (Dunham, O'dell, & Molina, 2003).

La clasificación taxonómica de la cepa identificada se detalla en la tabla 5:

Tabla 5.

Clasificación taxonómica de la cepa en estudio.

Categoría	Nombre
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>Bassiana</i>

FUENTE: el autor

El aislamiento en este trabajo de grado presentó sólo una banda de 600 pb de tamaño, coincidiendo con Montesinos y colaboradores (2011), cuyo producto de amplificación fue de 596 pb. En contraste, Echeverría (2006) obtuvieron diferentes patrones de bandas de variable intensidad y alta reproducibilidad para *B. bassiana*, por lo que comparó sus secuencias con varios locus de GenBank, desde Ba01 a Ba13.

Ramos Delgado (2016) también empleó los cebadores ITS1 e ITS4, aunque empleó un marcador de peso molecular de tan sólo 100 pb, obteniendo al igual que en este trabajo identidades moleculares del 99 y 100% con las secuencias de ADN descritas para *B. bassiana* en 18 accesiones de CENICAFÉ, desde la accesión número IBL03043 a la accesión número AY 334539.

Por otro lado, Montesinos-Matías y colaboradores (2011), emplearon los cebadores ITS4 e ITS5 y alcanzaron un porcentaje de similitud genética superior al 99 % para la secuencia de nucleótidos obtenida para *B. bassiana*, con respecto a la secuencia nucleótidos de *Cordyceps bassiana* descrita en la accesión número HM189220. Indujeron que *B. bassiana* es la fase asexual de *Cordyceps bassiana*.

Así mismo, Bravo y colaboradores (2016), coincidieron con la la secuencia genética de *B. bassiana* obtenida por Loc y colaboradores (2011); Alvarado y Rivera, (2016); Huang y colaboradores (2015). Alcanzaron un porcentaje de identidad genética alto, correspondiente al 97%, en contraste con la secuencia de nucleótidos descrita en la accesión número JX270638.197.

4.2.1.3. Análisis bromatológico

No se encuentra en la literatura estudios donde se haya realizado análisis proximales relevantes al hongo *B. bassiana*, probablemente porque sus aplicaciones no están relacionadas con la industria alimentaria, debido a su alto contenido de toxinas. Sin embargo, se reporta el análisis de metabolitos secundarios por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR, por sus siglas en inglés), en los cuales se cuantifica su contenido de alcoholes,

fenoles, alcanos, alquenos, nitrilos, compuestos aromáticos, ácidos carboxílicos, aminas alifáticas, aminas primarias y cetonas (Ragavendran, Dubey, & Natarajan, 2017).

4.2. Protocolo de conservación para la especie *Beauveria bassiana* por liofilización.

4.2.1. Resultados

4.2.1.1. Liofilización

En la figura 13 se observa las muestras después de la liofilización.



Figura 13. Cepas de *Beauveria spp.* liofilizadas

FUENTE: el autor

4.2.1.2. Control de parámetros de operación

Los parámetros de operación se controlaron mediante el software Wizard 2.0, propio del equipo liofilizador (ver figura 14). El sistema de control cuenta con un programa PICBASIC, un paquete de hardware personalizado y un microprocesador integrado para proporcionar una automatización completa del proceso, gestión de receta y alarma. La receta empleada para realizar todo el proceso automatizado fue la PRINC.rcw.

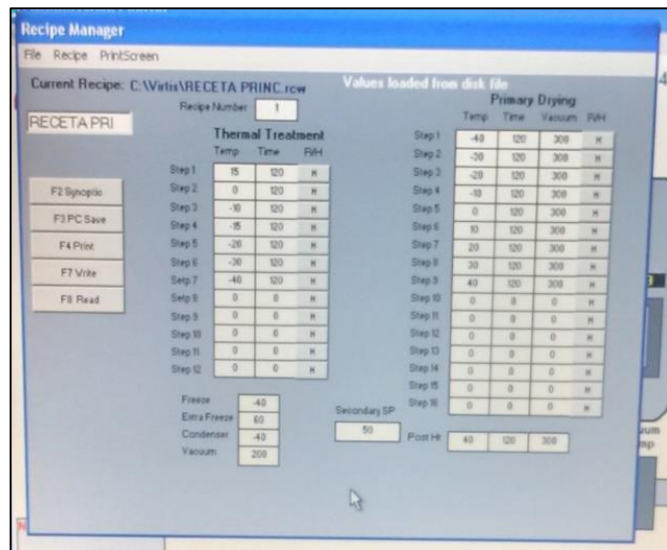


Figura 14. Valores de los parámetros de operación automatizados.

FUENTE: el autor

4.2.2. Discusiones

La liofilización es un método de conservación para cultivos fúngicos esporulados (Homolka, 2014). Algunas ventajas de las cepas fúngicas liofilizadas es que requieren poco espacio para el almacenamiento, no necesitan mantenimiento constante, pueden enviarse sin requisitos especiales, presentan muy baja variabilidad genética y conservan la viabilidad a largo plazo. Además, debido a la baja Actividad de Agua (AW, por sus siglas en inglés) inhibe los procesos de infección e infestación que puedan sufrir las colonias (Cañedo & Ames, 2004; Puerto *et al.*, 2009; Voyron *et al.*, 2009).

Al inicio de la liofilización los cultivos fúngicos son congelados a baja presión mediante un descenso de temperatura hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, evitándose la cristalización intracelular mediante la regulación de la velocidad de enfriamiento, la cual depende del tamaño de la célula y del grosor de la pared celular. Posteriormente, los cultivos son deshidratados mediante sublimación del agua sólida por un aumento de la temperatura hasta $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una caída de la presión, hasta que la humedad se reduzca a menos del 5%, evitándose la fase líquida (Homolka, 2014).

Durante la liofilización, los componentes celulares del hongo presentan funciones biológicas de gran importancia, tal es el caso de las proteínas de membrana, que protegen a la célula contra la desnaturalización durante el enfriamiento lento, y de los sacáridos celulares, que permite que el líquido intracelular permanezca en estado sólido mientras sublima (Homolka, 2014).

Otros autores han propuesto protocolos de liofilización de hongos con una temperatura de congelación de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, condensación de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y secado de 35 y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión de vacío, seguido de almacenamiento en refrigeración entre 2 y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Burguet, Sierra, & Brito, 2012). También se reporta liofilización a 131 atmósferas de presión y una temperatura de -55°C durante 24 horas, con un subsecuente almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Galarza, 2011).

El Tiempo de incubación previo a la liofilización es un factor que influye en la resistencia de las cepas al tratamiento térmico. Ortiz y colaboradores (1995) realizaron la incubación de *Beauveria bassiana* a 30°C durante 48 horas obteniendo cepas más resistentes a la liofilización que aquellas que obtenidas con 14 días de incubación.

4.3. Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Beauveria bassiana*

4.3.1. Resultados

4.3.1.1. Velocidad de crecimiento

Las cepas de trabajo de *Beauveria spp.* se muestran en la figura 15. Se observó en todas las réplicas que el medio MEA presenta mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) que el PDA, aunque la densidad del micelio es menor.

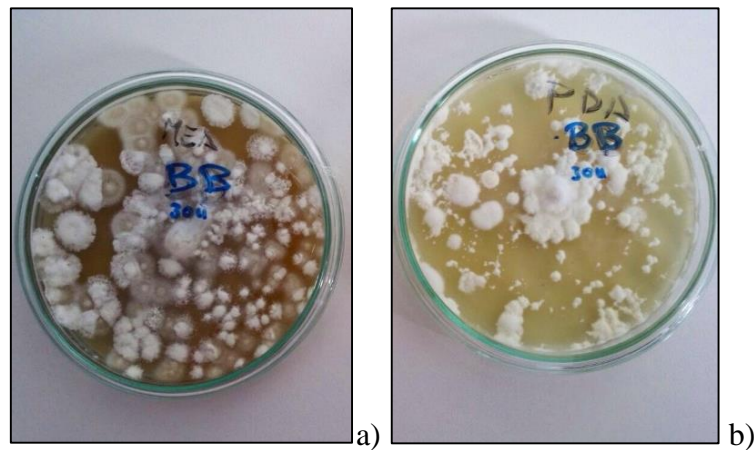


Figura 15. Cepas puras de *Beauveria spp.* en medio MEA (a) y medio PDA (b).

FUENTE: el autor

La figura 16 representa la velocidad de crecimiento de las cepas en los medios de cultivo por tratamiento; donde R significa réplica. Se observa que el medio de cultivo MEA es el que presenta mayor velocidad de crecimiento radial, en contraste con PDA, lo que aplica para todas las réplicas.

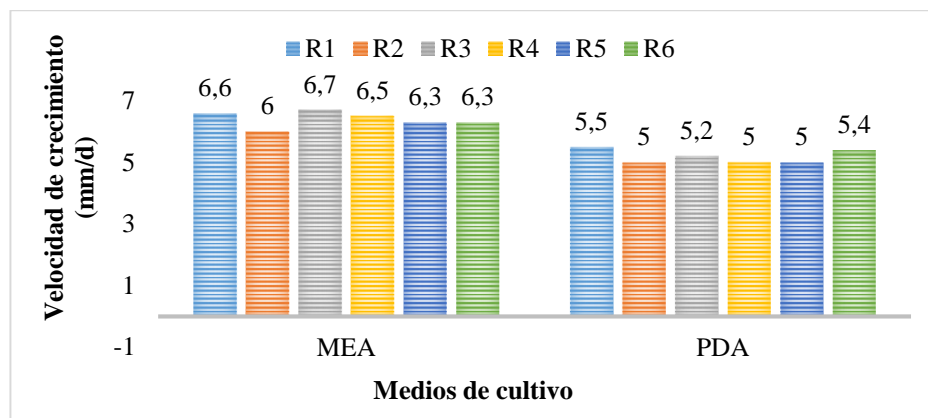


Figura 16. Velocidad de crecimiento de *B. bassiana* en los MEA y PDA por tratamiento

FUENTE: el autor

4.3.1.2. Tratamiento estadístico

La figura 17 muestra gráficamente las velocidades medias por medio de cultivo. Se observa claramente que MEA es el medio que permite el mayor crecimiento de *B.*

bassiana. También se evidencia que la dispersión intragrupal en ambos medios de cultivo es muy semejante.

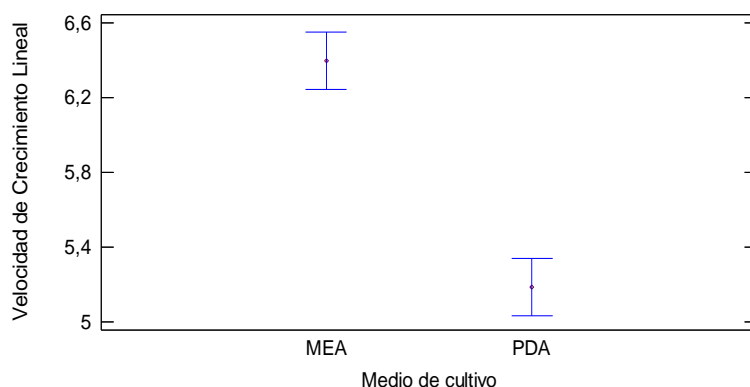


Figura 17. Gráfico de velocidad media por medio de cultivo

FUENTE: R statistic, 2018

En la Tabla 6 se presenta el resumen estadístico de la velocidad para cada uno de los medios de cultivo. Se observa que la dispersión intragrupal en ambos medios de cultivo es de aproximadamente el 4%, aunque el rango en el nivel MEA es 0,2 unidades mayor. Los valores de curtosis muestran que ambos grupos de datos presentan una distribución con apuntamiento platicúrtico con colas más anchas que la normal. Los valores de sesgo muestran que los datos en MEA presentan una leve asimetría negativa mientras los datos en PDA presentan una leve asimetría positiva, de modo que el conjunto de datos de velocidad de crecimiento radial en general presenta una distribución con un leve sesgo hacia la derecha, muy cercano a cero (típico de una distribución normal).

Tabla 6.

Resumen Estadístico para Velocidad de crecimiento

Medio	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo	Curtosis
MEA	6	6,40	0,25	0,04	6,0	6,7	0,7	-0,56	-0,08
PDA	6	5,18	0,22	0,04	5,0	5,5	0,5	0,64	-0,90

FUENTE: el autor

Se evaluaron los supuestos de la estadística paramétrica: la normalidad y la homocedasticidad (igualdad de varianzas).

Para evaluar la normalidad visualmente, se realizó el Gráfico de Probabilidad Normal o Gráfico Cuantil-Cuantil (Q-Q Plot, por su traducción al inglés). Se observa en la figura 18 que, el conjunto de datos no está muy alejado de la distribución normal.

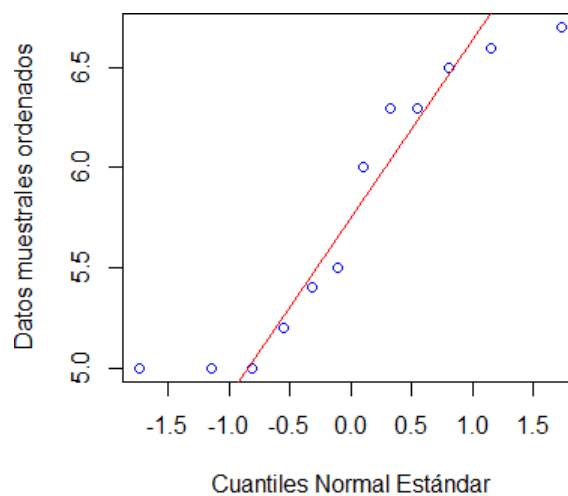


Figura 18. Q-Q plot para la velocidad de crecimiento radial

FUENTE: R statistic, 2018

La Prueba de Shapiro-Wilk arrojó un valor P de 0,06551, superior al nivel de significancia de 0,05, por lo que se acepta H_0 y se comprueba que los datos muestrales provienen de una población con distribución normal. La prueba de Jarque-Bera dio un valor P de 0,5063, superior al nivel de significancia de 0,05, por lo que se acepta H_0 y se infiere que la muestra tiene la asimetría y la curtosis de una distribución normal. La Prueba de Levene suministró un valor P de 0,8284, superior al nivel de significancia de 0,05, por lo que se acepta H_0 y se afirma que las varianzas poblacionales son iguales. La Prueba de Levene suministró un valor P de 0,8284, superior al nivel de significancia de 0,05, por lo que se acepta H_0 y se afirma que las varianzas poblacionales son iguales.

Una vez cumplidos los supuestos más importantes de la estadística paramétrica, se realizó el ANOVA (ver tabla 7), que arrojó un valor P de $4.86e^{-06}$, menor que el nivel de significancia de 0,05, por lo que se rechaza H_0 y se comprueba que existe una

diferencia estadísticamente significativa entre la media de la velocidad de crecimiento lineal de un medio de cultivo y otro.

Tabla 7.

ANOVA para Velocidad de crecimiento promedio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,44	1	4,44	78,14	4.86e ⁻⁰⁶ ***
Intra grupos	0,59	10	0,06		
Total (Corr.)	5,01	11			

FUENTE: R statistic, 2018

4.3.2. Discusiones

4.3.2.1. Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento radial más alta fue de 6,7 mm/d y corresponde al medio MEA, mientras la más baja fue de 5,0 mm/d y corresponde al medio PDA. Los resultados superaron las velocidades de crecimiento reportadas por Echeverría Beirute (2006), que variaron entre 0,68 y 2,43 mm/d.

El medio de cultivo PDA se compone de los polisacáridos y minerales obtenidos de una infusión de papa más agar y dextrosa en agua; mientras que el medio de cultivo MEA se compone de maltosa, peptona, glicerol y agar en agua (Narrea & Malpartida, 2006). El medio PDA es sólo una fuente de carbono y minerales, mientras que el medio MEA incluye también nitrógeno en su composición.

El nitrógeno es vital para el desarrollo del hongo, porque en proporciones adecuadas promueve, tanto el crecimiento micelial como la esporulación e infectividad (Jaronski & Mascarín, 2016). Es por ello que, en este trabajo la velocidad promedio de crecimiento radial de *Beauveria bassiana* durante 6 días en MEA fue superior a la de crecimiento en PDA.

4.3.2.2. Tratamiento estadístico

MEA es el medio que permite el mayor crecimiento de *B. bassiana*. La velocidad media de crecimiento en MEA es de 6,4 mm/d mientras que en PDA es de 5,2 mm/d. La composición del medio de cultivo tiene influencia estadísticamente significativa sobre la velocidad de crecimiento de *B. bassiana*, ya que los medios ricos en nutrientes promueven el crecimiento radial de la colonia. Sin embargo, el crecimiento micelial no está definitivamente correlacionado con el rendimiento conidial (Safavi *et al.*, 2007).

4.4. Catálogo de cepas puras de *Beauveria bassiana*

4.4.1. Resultados

Se propone el protocolo representado en la figura 19 para la obtención de cepas con potencial industrial.

4.4.1.1. Uso del catálogo

La información de las cepas contiene el nombre científico, el código asignado, procedencia, medio de cultivo, temperatura de crecimiento y conservación de la cepa de *Beauveria bassiana* aislada en el laboratorio del CEBA. Además, se presenta cepas de algunos BRGM.

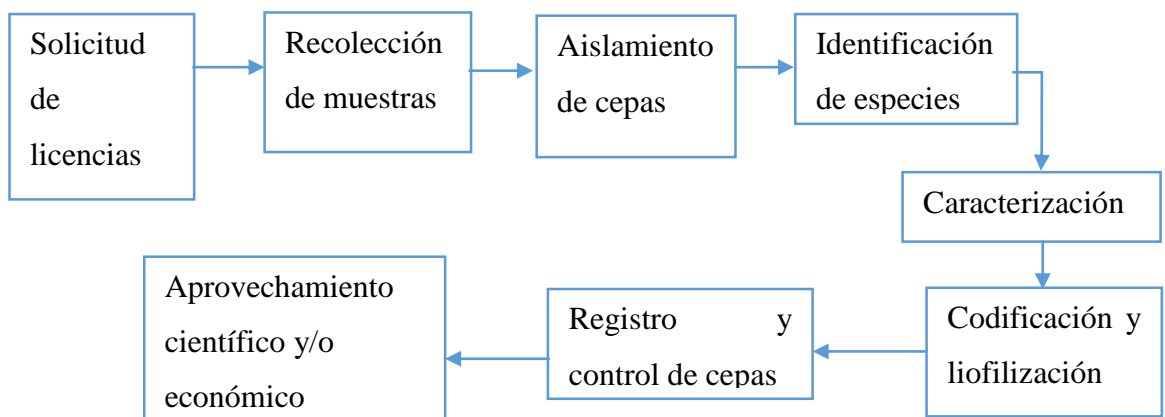


Figura 19. Protocolo para el establecimiento de un BRGM para *Beauveria spp.*

FUENTE: el autor

4.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de *Beauveria bassiana* CEBA-IIE-TA-010116

Medio de cultivo (comercial o de fórmula)	Agar Extracto de Malta (MEA)
	Agar Papa Dextrosa (PDA)
Temperatura de incubación	22 ° C
Tiempo de incubación	Siete días
Conservación	Liofilización

4.1.1.3. Formula medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA)	
Papa pelada (g)	*200
Glucosa (g)	20
Agar (g)	15
Agua destilada (ml)	1000

* Los 200 g de papa son cocinados con cierta cantidad de agua y luego filtrados. El filtrado contiene alrededor de 4 g de papa en base seca.

Agar Extracto de Malta (MEA)	
Extracto de malta en polvo (g)	20
Peptona (g)	1
Glucosa (g)	20
Agar (g)	20
Agua destilada (ml)	750

4.1.1.4. Suministro de cultivos

En el presente catalogo se presenta una cepa nativa aislada en el laboratorio del CEBA, con el objetivo de que esté a disposición de la academia y la industria, en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) (Programa de Naciones Unidas, 2011).

Las cepas deben estar debidamente envueltas con película plástica y rotuladas con toda la información necesaria acerca de las fuente de aislamiento, condiciones de cultivo, manipulación, conservación y recuperación, así como las publicaciones científicas relacionadas (ICIDCA, 2003).

4.1.1.5. Conservación de los cultivos

Por liofilización con el uso del equipo VirTis y su software wizard 2.0.

4.1.1.6. Identificación

Identificación molecular de hongos por extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y contraste de resultados con la base de datos GenBank.

4.1.1.7. Depósito de cultivos

Se debe presentar una solicitud por escrito con toda la información del cultivo para su posterior aprobación una vez que se realicen los estudios necesarios.

4.1.1.8. Precios de cepas y otros servicios





Con fines investigativos	\$40 USD
Para la Industria	\$120 USD
Con fines docentes	\$60 USD



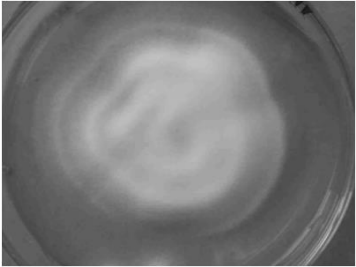


4.1.1.9. Listado de *Beauveria bassiana* stock


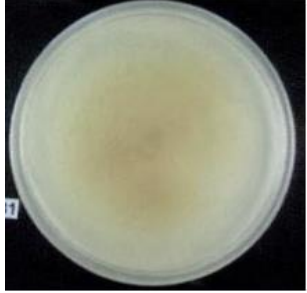
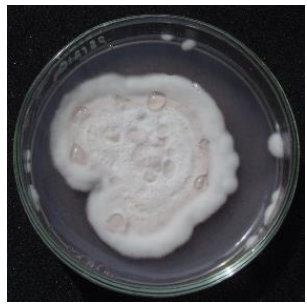
En la tabla 8, se presenta un listado de cepas de *B. bassiana*.

Tabla 8.

Listado de cepas de B. bassiana.

Código	Medio de Cultivo	Foto	Fuente
Ceba-BB-20u	MEA		CEBA
Ceba-BB-30u	PDA		CEBA
C8-225	Agar Saboraud		ICIDCA
PTCC 51-97	SDYA		Organización de Investigación Iraní para la Ciencia y Tecnología

Código	Medio de Cultivo	Foto	Fuente
LF14	Lactrimel-agar		Universidad de los Andes
B 560010	PDA		Ponalab Biogrowth
Bb-105	PDA, MEA, Saboraud		Laboratorios Provinciales de Sanidad Vegetal (LAPROSAV)
Bv025	Agar Papa Sacarosa		Corpoica
A03	PDA		CICAFE

Código	Medio de Cultivo	Foto	Fuente
Bb-114	PDA		FUNICA
CIP81	Agar agua, Sabouraud, PDA		International Potato Center
CCB-LE 262	Arroz		Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA)

FUENTE: el autor

4.4.2. Recuperación de cultivos liofilizados

Retirar el tapón de algodón, adicionar entre 0,2 – 0,3 ml de medio líquido estéril para rehidratar el cultivo y se sumergir durante 20 o 30 minutos hasta conseguir una rehidratación completa. Con la suspensión obtenida inocular las cajas de Petri que contienen el medio de cultivo e incubar a 22 °C hasta observar crecimiento. No considerar inviable ningún cultivo hasta antes de las dos semanas, ya que algunas cepas presentan un largo período de latencia (Escandino, 2017).

4.5. Discusiones

Los catálogos son un conjunto ordenado de registros que permite el control y recuperación de la información sobre las colecciones almacenadas (Spedalieri, 2006); han constituido la base primordial sobre la cual se ha construido la sistemática de los organismos vivos a partir de su historia evolutiva (Lamothe, García, Osorio, & Pérez, 1997).

Los catálogos son considerados como las “biblias” de las colecciones biológicas, ya que tienen registrada la información de cada uno de los ejemplares almacenados en ellas. Contienen la información de las etiquetas (identificación taxonómica, lugar y fecha de colecta, coordenadas geográficas, nombre y número de colector), el listado de reactivos empleados en la preparación de los ejemplares, la forma de mantenimiento de los mismos, los permisos de colecta, la correspondencia, entre otros (Colecciones biológicas IAvH, 2015; Simmons & Muñoz-Saba, 2005).

Los catálogos fúngicos brindan información sobre los recursos de hongos disponibles en una colección, por lo que son valiosos para aquellos investigadores que usan el método comparativo dentro de sus programas de investigación (Lamothe *et al.*, 1997). La información debe ser clara, legible y completa (Simmons & Muñoz-Saba, 2005). Ofrecen servicios de soporte esenciales, como la identificación o caracterización de aislados, y proporcionan datos útiles asociados para mejorar las actividades de I + D (Smith, 2014). Tal información juega también un rol importante en la industria porque de su veracidad y claridad depende la calidad del producto y el cumplimiento de la normatividad vigente (Smith, 2014); por ejemplo, unas malas condiciones de almacenamiento y malas prácticas de mantenimiento de ejemplares alteran la calidad del producto, poniendo en riesgo las utilidades de la empresa y/o la salud del consumidor.

Según el doctor Héctor Hernández “el valor de una colección biológica radica en su representatividad, calidad y rigor de la información asociada a los ejemplares y por supuesto, en su accesibilidad” (Lamothe *et al.*, 1997, p. 9), por lo que es una gran responsabilidad la creación de un catálogo con datos verídicos y cifras exactas.

Los catálogos también permiten a la comunidad conocer la riqueza biológica que los rodea, sus aplicaciones y los riesgos de su mal uso, y los concientiza de la importancia de la conservación de la biodiversidad regional (Palomera *et al.*, 2015), , por lo que es una gran reto su difusión. La exposición itinerante constituye una forma de favorecer la transferencia del conocimiento para la educación ambiental.

Una de las ventajas de los catálogos es que clasifican en categorías, por lo que no es necesario describir cada objeto que se ingresa, simplemente se emplea un tipo de nomenclatura científica, permitiendo ahorrar tiempo y trabajo (Simmons & Muñoz-Saba, 2005). Lo anterior resulta muy conveniente, ya que las colecciones biológicas albergan muchos ejemplares.

CAPÍTULO V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Se obtuvieron cepas puras de *B. bassiana* procedentes de suelo de cafetales, las cuales presentaron calidad del 99%, identidad genética del 100% y velocidad de crecimiento radial promedio de 6,4 mm/día. Además, mostraron alto contenido de Extracto Libre de Nitrógeno (76,74 %) y de proteínas (16,74 %), así como de minerales como Fósforo, Calcio y Potasio, principalmente.
- El medio de cultivo MEA es el que permite la mayor velocidad de crecimiento de *B. bassiana*, ya que mostró diferencias estadísticamente significativas en contraste con el medio PDA.
- Se desarrolló un protocolo de liofilización apropiado para *B. bassiana* que permita su conservación en un Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM), así mismo, se elaboró un catálogo de cepas que facilite la labor de búsqueda del empresario, del investigador y de la comunidad en general.
- El estudio de especies nativas como biocontroladores es de vital importancia, ya que la difusión de su uso permite disminuir el uso de agroquímicos, los cuales son nocivos para el medio ambiente y para el ser humano.
- La creación de BRGM locales permite la conservación y acceso seguro a material genético de calidad con fines académicos, ecológicos y comerciales.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar la estabilidad genética, pureza y patogenicidad de las cepas liofilizadas luego de cierto tiempo de almacenamiento en el BRGM, ya que según Puerto y colaboradores (2009), son los ensayos de control de los Lotes de Siembra de Referencia (LSR).
- Evaluar diferentes parámetros de liofilización tales como la temperatura, la presión y el tiempo de tratamiento térmico, y su efecto en la viabilidad e infectividad de las cepas. Así se tendrá un protocolo específico para la especie.
- Probar la cepa con otros medios de cultivo con y sin inductores de crecimiento, tales como el quitosano, levadura, peptona, aminoácidos, caseína, entre otros.
- Analizar el tiempo de viabilidad de las cepas liofilizadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acción Ecológica. (2013). El Protocolo de Nagoya, la mercantilización de la biodiversidad y los conocimientos tradicionales. Retrieved from <http://www.accionecologica.org/editoriales/1708-el-protocolo-de-nagoya-la-mercantilizacion-de-la-biodiversidad-y-los-conocimientos-tradicionales>
- Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Kyamanywa, S. (2009). The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana (*Musa* sp.) plants. *Biological Control*, 49(1), 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.06.002>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World Agriculture: towards 2015-2030: the 2012 revision* (No. 12-03). Rome.
- Allee, L. L., Goettel, M. S., Gol'berg, A., Whitney, H. S., & Roberts, D. W. (1990). Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following per os inoculation. *Mycopathologia*, 111(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/BF02277296>
- Altier, N., Beyhaut, E., Rizza, M., & Rivas, F. (2012). Plataforma De Bioinsumos De Uso Agrícola En Base a Microorganismos Benéficos. *INIA*, (29), 47–50.
- Alvarado, L., & Rivera, W. (2016). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. in Garlic and Onion Fields and In Vitro Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*. *Sociedade Brasileira de Ciência Do Solo*, v40:e01504, 9. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150454>
- Alves, B., Filho, A. B., & Roberts, D. W. (2003). Effect of salts , vitamins , sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales : Batkoa , Furia , and Neozygites, 107(July), 872–878. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007974>
- Alves, S. B. (1998). *Controle microbiano de insetos* (2nd ed.). Piracicaba: FEALQ.

- Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300160104>
- Archuleta-Torres, A., García-Gutiérrez, C., Ruelas, R. D., Gaxiola-Castro, L. A., & López, M. Á. (2012). Aislamiento de *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* con medio selectivo y pruebas de roxicidad contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. *Revista Entomología Mexicana*, *11*(1), 266–269. Retrieved from <http://www.entomologia.socmexent.org/revista/entomologia/2012/CB/266-269.pdf>
- Asamblea Nacional. República de Ecuador. Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación (2016).
- Asamblea Nacional. Constitución de la República del Ecuador, Pub. L. No. Registro Oficial 449, 218 (2008). Quito-Ecuador. Retrieved from http://www.asambleanacional.gov.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J. A. L., Mahillon, J., & Pérez, M. H. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, *6*, 90–99.
- Banco Mundial [BM]. (2016). Población Mundial. Retrieved June 20, 2008, from <http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL>
- Barron, G. (2001). *George Barrons Website on Fungi*. Ontario, Canadá. Retrieved from <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>
- Bartlett, M. C., & Jaronski, S. T. (1988). Mass production of entomopathogenous fungi for biological control of insects. In M. N. Burge (Ed.), *Fungi in Biological Control Systems* (pp. 61–85). Manchester, UK: Manchester University Press. [https://doi.org/10.1002/jctb.280480109View/save citation](https://doi.org/10.1002/jctb.280480109View/save%20citation)
- Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A., & Khachatourians, G. G. (1987a). Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*, *99*(2), 77–83. <https://doi.org/10.1007/BF00436909>
- Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A., & Khachatourians, G. G. (1987b). Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures, *83*, 77–83.
- Blackburn, H. D., & Boettcher, P. J. (2010). Options and legal requirements for national and regional animal genetic resource collections. *Animal Genetic*

- Resources*, 47, 91–100. <https://doi.org/10.1017/S2078633610000998>
- Bradleighvinson, S., & Siebeneicher, S. R. (1991). Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 285, 280–285.
- Bravo, V., Ronquillo, M., Martinez, M., & Quezada, G. (2016). EFECTO ENRAIZADOR DE *Trichoderma asperellum* EN EL CULTIVO DE PALMA ACEITERA, 20–27.
- Brechelt, A. (2010). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Santiago de Chile: O'Reilly Media publishers.
- Brownbridge, M., Reay, S. D., Nelson, T. L., & Glare, T. R. (2012). Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of *radiata pine* seed and seedlings. *Biological Control*, 61(3), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.002>
- Burguet, N., Sierra, N., & Brito, L. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 1–4.
- Cai, B. L., & Liu, A. X. (1988). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to cockroaches. In Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 101–103). Beijing: Academic Periodical Press.
- Cajas-Suárez, Y. N. (2012). *Caracterización morfológica y fisiológica de Beauveria sp. entomopatógeno de Hypothenemus hampei*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Campos, É., & Freire, C. (2016). Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.006>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Castrillo, L. A., Ugine, T. A., Filotas, M. J., Sanderson, J. P., Vandenberg, J. D., & Wraight, S. P. (2008). Molecular characterization and comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates (Ascomycota: Hypocreales) associated with the

- greenhouse shore fly, *Scatella tenuicosta* (Diptera: Ephydriidae). *Biological Control*, 45(1), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.10.010>
- Charnley, A. K., & Leger, R. J. St. (1991). The Role of Cuticle-Degrading Enzymes in Fungal Pathogenesis in Insects. In G. T. Cole & H. C. Hoch (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (pp. 267–286). New York: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7_12
- Chen, C. J., Wu, J. W., Li, Z. Z., Wang, Z. X., Li, Y. W., Chang, S. H., ... Tan, Y. C. (1990). Application of microbial pesticides in IPM China. In C. J. Cheng (Ed.), *Integrated Management of Pine Caterpillars in China* (pp. 214–308). Beijing: Forestry Publishing House.
- Coates, B. S., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (2002). *Beauveria bassiana* Haplotype Determination Based on Nuclear Rdna Internal Transcribed Spacer Pcr-Rflp. *Mycological Research*, 106(1), 40–50.
- Cole, D. C., Sherwood, S., Crissman, C., Barrera, V., & Espinosa, P. (2002). Pesticides and Health in Highland Ecuadorian Potato Production: Assessing Impacts and Developing Responses. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 8(3), 182–190. Retrieved from <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Pesticedes.pdf>
- Colecciones biológicas IAvH. (2015). Protocolo para el depósito de especímenes: Colecciones de especímenes y de sonidos ambientales IAvH. Bogotá D.C.: Instituto Humboldt.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe [CEPAL], Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], & Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (2015). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2015 - 2016* (Sexta). San José: CEPAL, FAO, IICA.
- Couch, T. L., & Ignoffo, C. M. (1981). Microbial Control Formulation of insect pathogens. In H. D. Burges (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant diseases 1970-1980* (pp. 621–634). London: Academic Press.
- Crissman, C., Cole, D. C., & Carpio, F. (1994). Pesticide Use and Farm Worker Health in Ecuadorian Potato Production. *American Journal of Agricultural Economics*, 76(3), 593–597. Retrieved from

<http://www.jstor.org/stable/1243670>

- Cruz-Barrera, F. M. (2014). *Desarrollo de un proceso de fermentación sólida, para el hongo Trichoderma asperellum Th204 en un fermentador de lecho fijo*. Universidad Nacional de Colombia Facultad.
- Cruz, D. J. (2004). Fungario. Retrieved June 20, 2008, from <http://coleccionbiologicas.utpl.edu.ec/fungario>
- Cubillos, C., Goretti, M., & Lizcano, R. (2014). AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp., EN LAS UNIDADES PRODUCTIVAS AGRÍCOLAS DEL CENTRO DE FORMACIÓN AGROINDUSTRIAL LA ANGOSTURA DE CAMPOALEGRE (HUILA), 15–20.
- DENAREF. (2011). Departamento Nacional de Recursos fitogenéticos: misión, visión, objetivos, actividades. Documento de difusión. Retrieved from <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2660>
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M., & Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. *Plateforme de Prédéveloppement En Biotechnologie*, 200–205.
- Dou, K., Wang, Z., Zhang, R., Wang, N., Fan, H., Diao, G., & Liu, Z. (2014). Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene Asp55 from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiol. Res.*, 169(12), 915–923. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.04.006>
- Duarte, F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *Contabilidad y Negocios*, 7(14), 81–100.
- Dunham, S. M., O'dell, T. E., & Molina, R. (2003). Analysis of nrDNA sequences and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadenis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*, 107(10), 1163–1177. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008475>
- Echeverría Beirute, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Ecuador. Reglamento Nacional de Aplicación de la Decisión 391 sobre Acceso a los

- Recursos Genéticos. Registro Oficial 553 de 11 de octubre de 2011. (2011).
- Ehrlich, P. R. (1968). *The Population Bomb*. New York: Ballantine Books.
- Elliot, S. L., Sabelis, M. W., Janssen, A., Van der Geest, L. P. S., Beerling, E. A. M., & Fransen, J. (2000). Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters*, 3(3), 228–235. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00137.x>
- Escandino, A. (2017). *INSTRUCCIONES PARA LA RECUPERACIÓN DE CULTIVOS LIOFILIZADOS*. Valencia. Retrieved from https://www.uv.es/cect2/47_ITs_Apertura_liofilo
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*, 11(11), 517–540. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6584>
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador* (1st ed.). Quito: EcoCiencia, INIAP, MAE y Abya Yala. Retrieved from <http://www.ecociencia.org/archivos/Biodiversidadyrecursosgeneticos-110922.pdf>
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., & Wraight, S. P. (2012). Application of modified atmosphere packaging (gas flushing and active packaging) for extending the shelf life of *Beauveria bassiana* conidia at high temperatures. *Biological Control*, 61(1), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.008>
- Feng, M. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3–34. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159409355309>
- Feng, M. G., Pu, X. Y., Ying, S. H., & Wang, Y. G. (2004). Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. *Crop Protection*, 23(6), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.004>
- Ferron, P., Fargues, J., & Riba, G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. In D. K. Arora, L. Ajello, & K. G. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Mycology* (Vol. 2, pp. 665–706). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (1996). *Declaración*

- de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial y plan de acción de la cumbre mundial de la alimentación* (No. 338.19 C969d). Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/003/w3613s/w3613s00.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2003). *EL Programa Especial para la Seguridad Alimentaria: Respuesta a los nuevos desafíos*. Retrieved June 20, 2008, from <http://www.fao.org/docrep/006/ac828s/ac828s00.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2009a). *Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria* (No. WSFS 2009/2). Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2009b). *How to Feed the World in 2050*. High-level expert Forum 12-13 October. Rome. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf
- Freire Fierro, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press ix.
- Galarza, L. L. (2011). *Aislamiento e identificación molecular de Trichoderma spp.* Escuela Superior Politécnica del Litoral. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30239>
- García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B., Medrano-Roldán, H., & Solís-Soto, A. (2013). Study of the mixing conditions in bioreactor for blastospores production of *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 47–54. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a06.pdf>
- García, M. X., Villamizar, L. F., Torres, L. A., & Cotes, A. M. (2006). *bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 77, 50–56.
- Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Garrido-Jurado, I., Fernández-Bravo, M., Campos, C., & Quesada-Moraga, E. (2015). Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five

- Mediterranean cropping systems. *Journal of Invertebrate Pathology*, *130*, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.001>
- GenBank. (2017). *Beauveria bassiana* isolate A2B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Accessi.
- Glare, T. R., Jackson, T., & Cisternas, E. A. (1993). *Beauveria vermiconia* (deuteromycete) is an entomogenous fungus. *Mycological Research*, *97*, 336–338.
- Glare, T. R., Reay, S. D., Nelson, T. L., & Moore, R. (2008). *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycological Research*, *112*(3), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.015>
- Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 213–249). Yakima, WA, EE. UU: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50013-0>
- Goldman, E., & Green, L. H. (2008). *Quantitation of Microorganisms. Practical Handbook of Microbiology* (2nd ed.). CRC Press.
- Gómez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis*, *30*(17), 2996–3005. <https://doi.org/10.1002/elps.200900192>
- González, D. M., & Jiménez, J. N. (2014). Colecciones microbianas : Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*, *4*(1), 23–33. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v18n1/vac04109.pdf>
- Grandjean, P., Harari, R., Barr, D. B., & Debes, F. (2006). Pesticide Exposure and Stunting as Independent Predictors of Neurobehavioral Deficits in Ecuadorian School Children. *Pediatrics*, *117*(3), e546–e556. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1781>
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, *95*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>

- Grieshop, J. I., & Winter, D. M. (1989). Agricultural pesticide accidents and prevention in Ecuador. *Accident Analysis & Prevention*, 21(4), 394–398. [https://doi.org/10.1016/0001-4575\(89\)90033-X](https://doi.org/10.1016/0001-4575(89)90033-X)
- Hajek, A. E. (1997). Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens. In J. G. Jones (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (pp. 193–249). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9074-0_5
- Hajek, A. E., Papierok, B., & Eilenberg, J. (2012). Methods for study of the Entomophthorales. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (2nd ed., pp. 285–316). Yakima, WA, EE. UU: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00009-9>
- Hall, R. A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970–1980* (Burgess, H., pp. 483–498). London: Academic Press.
- Hall, R. A., & Papierok, B. (1982). Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance, 205–240.
- Hanke, G. (2012). El control biológico: base de la agricultura sostenible. *La Revista Agraria*, 144(13), 10–11.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1·5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Hegedus, D. D., Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1990). Applied Microbiology Biotechnology *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose, 641–647.
- Herrera Vásquez, S., & Rodríguez Yunta, E. (2004). Etnoconocimiento En Latinoamérica: Apropiación De Recursos Genéticos Y Bioética. *Acta Bioethica*, 10(2), 181–190. <https://doi.org/10.4067/s1726-569x2004000200006>
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus

- Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260>
- Hollingsworth, R. G., Lysy, A. M., & Matsumoto, T. K. (2011). Preliminary study of genetic variation in Hawaiian isolates of *Beauveria bassiana* [Hypocreales, Cordycipitaceae]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 422–425. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.12.008>
- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biology*, 118(2), 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Hu, Y., Chen, C., Ye, S., & Hu, H. (2018). Development of a novel isolation unit for entomophthoralean fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 155(April), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.010>
- Huang, Y., Mijiti, G., Wang, Z., Yu, W., Fan, H., Zhang, R., & Liu, Z. (2015). Functional analysis of the class II hydrophobin gene HFB2-6 from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*, 171, 8–20.
- Huang, Y. X. (1988). Experiment on the virulence of *Beauveria bassiana* to *Bombyx mori* in different culture stage. In Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 80–82). Beijing: Academic Periodical Press.
- Humber, R. A. (1997). Fungi — Preservation of Cultures. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 269–280. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Hurtig, A., San Sebastián, M., Soto, A., Shingre, A., Zambrano, D., & Guerrero, W. (2003). Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador. *Arco Environ Health.*, 58(4), 223–228. <https://doi.org/10.3200 / AEOH.58.4.223-228>
- ICIDCA. (2003). *Catálogo de Cepas Microbianas*. (M. Otero, Ed.). Habana, Cuba.
- Ignoffo, C. M., García, C., Kroha, M., & Crouch, T. L. (1982). Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology*, 75(2), 275–276.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, S. H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for

- managing insect pests. In T. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential* (pp. 23–69). Wallingford, UK.: CABI Publishing.
- Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. (2016). *Primer Informe sobre Biopiratería en el Ecuador*. Quito.
- Inter-American Development Bank [IDB]. (2016). Agriculture in Latin America by the numbers. Retrieved June 20, 2008, from <http://www.iadb.org/en/about-us/about-the-inter-american-development-bank,5995.html>
- Jaronski, S. T., & Mascarín, G. M. (2016). Mass Production of Fungal Entomopathogens. In L. A. Lacey (Ed.), *Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice* (pp. 141–155). Yakima, WA, EE. UU: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00009-3>
- Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2016). Challenges of Food Security – Need for Interdisciplinary Collaboration. *Procedia Food Science*, 6, 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.005>
- Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., ... Humber, R. A. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, 112, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.12.004>
- Keller, S., & Zimmerman, G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In N. Wilding, N. M. Collins, P. M. Hammond, & J. F. Webber (Eds.), *Insect-Fungus Interactions* (pp. 240–321). London, UK: Academic Press. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=DwO5_3N7sSAC&oi=fnd&pg=PA121&dq=Wilding,+collins,+Hammond++Insect-Fungus+Interactions+1989&ots=10WF3LBWzz&sig=xZ76xC7gwcNRX1slNG7qm8w9d9Q#v=onepage&q=Wilding, collins, Hammond Insect-Fungus Interactions 1989&f=f
- Khachatourians, G. G. (1991). Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In D. K. Arora, L. Ajello, & K. G. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Mycology* (Vol. 2, pp. 665–706). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Khachatourians, G. G. (1996). Biochemistry and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. In D. H. Howard & J. D. Miller (Eds.), *The mycota:*

- Human and Animal Relationships* (pp. 331–363). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10373-9_17
- Khan, S., Nadir, S., Lihua, G., Xu, J., Holmes, K. A., & Dewen, Q. (2016). Identification and characterization of an insect toxin protein, Bb70p, from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, using *Galleria mellonella* as a model system. *Journal of Invertebrate Pathology*, *133*, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.010>
- Kim, J. S., Kassa, A., Skinner, M., Hata, T., & Parker, B. L. (2011). Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(6), 697–704. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0850-2>
- Knudsen, G. R., Johnson, J. B., & Eschen, A. J. (1990). Alginate Pellet Formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi : Hyphomycetes) Isolate Pathogenic to Cereal Aphids. *Journal of Economic Entomology*, *83*(6), 2225–2228. <https://doi.org/10.1093/jee/83.6.22252225-2228>
- Kommanet, B. (1998). Eco Trade Manual: environmental challenges for exporting to the European Union. Rotter-dam: CBI. Retrieved from <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/980235>
- Kononova, E. V. (1978). Selection of commercial strains of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In *First Joint US/USSR Conference on the Production, Selection and Standardization of Entomopathogenic Fungi of the US/USSR Joint Working Group on the Production of Substances by Microbiological Means* (pp. 172–191). National Science Foundation (USA). Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19830883357>
- Lamichhane, J. R., Aubertot, J.-N., Begg, G., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., ... Messéan, A. (2016). Networking of integrated pest management: A powerful approach to address common challenges in agriculture. *Crop Protection*, *89*, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.011>
- Lamothe, R., García, L., Osorio, D., & Pérez, G. (1997). *Catálogo de la Colección Nacional de Helminthos*. UNAM.
- Laxminarayan, R. (2003). *Battling Resistance to Antibiotics and Pesticides: An*

Economic Approach. Washington D. C.: Resources for the future.

- Leckie, B. M., Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Jones, C. J., & Gwinn, K. D. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(7), 697–710. <https://doi.org/10.1080/09583150802262906>
- Lee, S. J., Kim, S., Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2016). Screen bag formulation of *Beauveria* and *Metarhizium* granules to manage *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3), 887–892. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.08.005>
- Leite, L. G., Batista Filho, A., Almeida, J. D., & Alves, S. B. (2003). Produção de fungos entomopatogênicos. *Ribeirão Preto: AS Pinto*, 59.
- Leopold, J., & Samšňáková, A. (1970). Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(1), 34–42. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90095-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90095-9)
- Liu, Q., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2011). Characterization of *Beauveria bassiana* neutral trehalase (BbNTH1) and recognition of crucial stress-responsive elements to control its expression in response to multiple stresses. *Microbiological Research*, 166(4), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.001>
- Loc, N. H., Quang, H. T., Hung, N. B., Huy, N. D., Thi, T., Phuong, B., ... Ha, T. (2011). *Trichoderma asperellum* Chi42 Genes Encode Chitinase. *Mycobiology*, 39(3), 182–186. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.182>
- Long, F. Z., & Du, K. H. (1988). Study on the pathogenic mechanism of *Beauveria bassiana* to the Masson's pine caterpillar. In Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 80–82). Beijing: Academic Periodical Press.
- Lopes, R. B. (2008). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. FEALQ.
- Love, I., & Pollanis, C. (2015). Health effects of pesticides on agricultural farmers in the developing countries of Fiji, Ecuador, the Philippines, and Costa Rica

versus the United States. Atlanta: Department of Biology, Spelman College. Retrieved from <http://www.isctjournal.com/wp-content/uploads/2015/07/Health-effects-of-pesticides-on-agricultural-farmers-in-the-developing-countries-of-Fiji-Ecuador-the-Philippines-and-Costa-Rica-versus-the-United-States.pdf>

- Luo, X., Keyhani, N. O., Yu, X., He, Z., Luo, Z., Pei, Y., & Zhang, Y. (2012). The MAP kinase Bbslt2 controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(7), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.05.002>
- Malthus, T. R. (1846). Ensayo sobre el principio de la población. Madrid: Est. Lit. y Tip. de Don Eusebio María del Valle y colaboradores. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=2aOuxVUqw6YC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Ensayo+sobre+el+principio+de+la+población+maltus&ots=7Fe1kZGWI&sig=PDUPeiBrMFyLbPDPPD_rllJqw98&redir_esc=y#v=onepage&q=Ensayo sobre el principio de la población maltus](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=2aOuxVUqw6YC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Ensayo+sobre+el+principio+de+la+población+maltus&ots=7Fe1kZGWI&sig=PDUPeiBrMFyLbPDPPD_rllJqw98&redir_esc=y#v=onepage&q=Ensayo+sobre+el+principio+de+la+población+maltus)
- Manosalvas, R., Estrella, J., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador* (1st ed.). Quito: EcoCiencia, INIAP, MAE y Abya Yala. Retrieved from <http://www.ecociencia.org/archivos/Biodiversidadyrecursosgeneticos-110922.pdf>
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1), 379–392. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00336-X)
- Marques, E. J., Alves, S. B., & Marques, I. M. R. (1999). Effects of the temperature and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(2), 153–160.
- Mata Astorga, M. (2008). *Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Retrieved from

[https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/544/Mata Moises.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/544/Mata_Moises.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Astorga

- McCluskey, K. (2017). Fungal Genetic Resources for Biotechnology. In I. Kurtböke (Ed.), *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications* (pp. 219–235). Maroochydore DC, Australia: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804765-1.00011-4>
- McDowell, J. M., Funderburk, J. E., Boucias, D. G., Gilreath, M. E., & Lynch, R. E. (1990). Biological activity of *Beauveria bassiana* against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on leaf substrates and soil. *Environmental Entomology*, *19*, 137–141. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9030096>
- Medina-Robles, V. M., Velasco-Santamaría, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2006). Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. *Revista ORINOQUIA*, *10*(1), 8.
- Medo, J., & Cagáň, Ľ. (2011). Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological Control*, *59*(2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.020>
- Medo, J., Michalko, J., Medová, J., & Cagáň, Ľ. (2016). Phylogenetic structure and habitat associations of *Beauveria* species isolated from soils in Slovakia. *Journal of Invertebrate Pathology*, *140*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.009>
- Mera-Orcés, V. (2001). The sociological dimensions of pesticide use and health risks of potato production in carchi, ecuador. In *Open Meeting of the Human Dimensions of Global Environmental Change Research Community* (p. 21). Rio de Janeiro-Brazil. Retrieved from https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http://sedac.ciesin.columbia.edu/openmeeting/downloads/1004629612_presentation_paperrio.doc
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2006a). Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research*, *110*(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.008>
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2006b). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture*,

- Ecosystems and Environment*, 113(1–4), 336–341.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.10.011>
- Meyling, N. V., Lübeck, M., Buckley, E. P., Eilenberg, J., & Rehner, S. A. (2009). Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*, 18(6), 1282–1293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04095.x>
- Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Decreto Número 3016 (27 de Diciembre) de 2013 (2013). Ecuador.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE]. (2015). Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030. Quito, Ecuador. Retrieved from https://info.undp.org/docs/pdc/Documents/ECU/ENBPA_2015-2030_Versión_final_21.07.2015.pdf
- Monte, E., & Llobell, A. (2003). *Trichoderma* in organic agriculture. In *V World Avocado Congress* (pp. 725–733). Retrieved from http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p725.pdf
- Monteagudo, C., Mariscal-Arcas, M., Heras-Gonzalez, L., Ibañez-Peinado, D., Rivas, A., & Olea-Serrano, F. (2016). Effects of maternal diet and environmental exposure to organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere*, 156, 135–142.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.103>
- Montealegre, J. R., & Pérez, L. M. (2013). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile* (Vol. 1). Santiago de Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- Monteros Guerrero, A., & Salvador Sarauz, S. (2015). Panorama agroeconómico del Ecuador: una visión del 2015. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Retrieved from http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/panorama_agro economico_ecuador2015.pdf
- Monteros Guerrero, A., Sumba Lusero, E., & Salvador Sarauz, S. (2013). *Productividad Agrícola en el Ecuador*. Quito. Retrieved from http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/indice_produc

tividad.pdf

- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Gallardo-Escamilla, F., & Loera, O. (2011). Variación de fenotipos de crecimiento y de virulencia en cepas mutantes de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. *Agrociencia*, 45(8), 929–942. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800006
- Monzón, A. (2000). Producción de hongos entomopatógenos. In *Producción y uso de hongos entomopatógenos* (pp. 10–35). Managua: FUNICA.
- Morales Estupiñán, C. (2001). *Las nuevas fronteras tecnológicas: promesas, desafíos y amenazas de los transgénicos*. Santiago de Chile. Retrieved from http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4490/S018664_es.pdf?sequence=1
- Murillo, B., Rueda, E. O., García, J. L., & Ruiz Espinoza, F. H. (2010). *Agricultura orgánica*. (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Ed.). Ciudad de México, México: Plaza y Valdés S.A.
- Narrea-Cango, M., & Malpartida-Zevallos, J. (2006). Evaluación de medios de cultivos en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas de hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. *Revista Peruana de Entomología*, 45, 145–147. <https://doi.org/http://doi.org/10.2903/j.efsa.20143927>. Available
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2018). GenBank. *Beauveria* spp. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=beauveria>
- Nora Altier, Elena Beyhaut, M. R. & F. R. (2012). Plataforma De Bioinsumos De Uso Agrícola En Base a Microorganismos Benéficos. *INIA*, (29), 47–50. Retrieved from <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/18429300612191129.pdf>
- OCDE/FAO. (2013). *Perspectivas Agrícolas 2013-2022*. Paris. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es
- Oerke, E.-C., & Dehne, H.-W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>

- Oliveira, D. G. P., Pauli, G., Mascarin, G. M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.021>
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2000). *Declaración del milenio. A/RES/55/2*. New York. Retrieved from <http://www.un.org/spanish/milenio/ares552.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). *Objetivos de Desarrollo del Milenio: informe de 2015*. (C. Way, Ed.).
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2002). Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Ginebra: OMS.
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2016). *Molecular Genetics of Beauveria bassiana Infection of Insects. Advances in Genetics* (Vol. 94). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>
- Ortiz, M., Patiño-vera, M., Galindo, E., Escalamiento, U. De, Bioingeniería, D. De, & Post, A. (1995). Estudio sobre la liofilización de esporas de *Trichoderma harzianum*, 15, 62250.
- Overmann, J. (2015). Significance and future role of microbial resource centers. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.008>
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Palomera García, C., Rivera Cervantes, L. E., García Real, E., Guzmán Hernández, L., & Ruan Tejada, I. (2015). Las colecciones biológicas “itinerantes” como instrumentos de educación ambiental. *Revista Iberoamericana Para La Investigación y El Desarrollo Educativo: RIDE*, 6(11). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5151554.pdf> <https://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=5151554>
- Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G., & Kim, K. (2009). Production of Blastospore of

- Entomopathogenic Submerged Batch Culture. *Mycobiology*, 37(3), 218–224.
- Pineda-insuasti, J. A. (2016). Banco ecuatoriano de recursos genético microbianos para la industria enzimática. Retrieved from <https://www.researchgate.net/project/Banco-ecuatoriano-de-recursos-genetico-microbianos-para-la-industria-enzimatica>
- Pineda, J. A., Ramos, L., Soto, C., Freitas, A., & Pereira, L. (2015). Growth of *Pleurotus ostreatus* on non-supplemented agro-industrial wastes. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 38(1), 41–49.
- Pineda, J. A., Soto, C. P., Santiago, N. F., Pónce, C. A., & Reyes, G. (2015). Selección de cepas nativas ecuatorianas del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) con fines industriales. *Revista Bionatura*, 1(1), 29–32.
- Pingali, P. L., Marquez, C. B., Palis, F. G., & Rola, A. C. (1995). The Impact of Pesticides on Farmer Health: A Medical and Economic Analysis in the Philippines. In P. L. Pingali & P. A. Roger (Eds.), *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment* (pp. 343–360). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0647-4_12
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (2016). Fungario QCA (M). Retrieved June 20, 2008, from <http://www.puce.edu.ec/portal/content/Fungario/442;jsessionid=2E8EC51E755E85>
- Posada, F., Aime, M. C., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Vega, F. E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological Research*, 111(6), 748–757. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.006>
- Posada, F., & Vega, F. E. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 97(6), 1195–1200. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1195>
- Programa de Naciones Unidas. Convenio Sobre La Diversidad Biológica, Convenio sobre la Diversidad Biológica § (2011). Canadá. Retrieved from <http://mail.cbd.int/doc/meetings/sbstta/sbstta-08/official/sbstta-08-08-add2-es.pdf>

- Prüss-Üstün, A., & Corvalán, C. (2005). *Preventing Disease through Healthy Environments: Towards an Estimate of the Environmental Burden of Disease*. Ginebra.
- Puerto, C., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocedo, M. D., & Martínez, R. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *VacciMonitor*, (1), 20–24.
- Quezada, F., Roca, W., Szauer, M. T., Gómez, J. J., & López, R. (2005a). *Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad: Capacidades locales y mercados potenciales*. Caracas: CAF. Retrieved from <http://publicaciones.caf.com/media/1275/99.pdf>
- Quezada, F., Roca, W., Szauer, M. T., Gómez, J. J., & López, R. (2005b). *Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad: Capacidades locales y mercados potenciales*. Caracas: CAF.
- Ragavendran, C., Dubey, N. K., & Natarajan, D. (2017). *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae): a potent fungal agent for controlling mosquito vectors of *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *RSC Adv.*, 7(7), 3838–3851. <https://doi.org/10.1039/C6RA25859J>
- Ramírez, P., & Cocha, J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos : aislamiento , caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Peru. Biol.*, 10(1), 67–77.
- Ramón, D., Morán, M., Costa, J., López, F., Arriola, A., Martín, A., ... Rodríguez, F. (2005a). Biotecnología en el Sector Alimentario. *Genoma España*, 5(2), 1–81. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ramón, D., Morán, M., Costa, J., López, F., Arriola, A., Martín, A., ... Rodríguez, F. (2005b). Biotecnología en el Sector Alimentario. *Genoma España*, 5(2), 1–81.
- Ramos Delgado, Y. J. (2016). *Identificación de hongos entomopatógenos de Diaphorina citri Kuwayama, en los departamentos del Valle del Cauca y Quindío, Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/53469/>
- Reay, S. D., Brownbridge, M., Cummings, N. J., Nelson, T. L., Souffre, B., Lignon, C., & Glare, T. R. (2008). Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation

- forests. *Biological Control*, 46(3), 484–494.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.006>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*, 97(1), 84–98.
<https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>
- Rehner, S. A., Posada, F., Buckley, E. P., Infante, F., Castillo, A., & Vega, F. E. (2006). Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 11–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.005>
- Roberts, D. W. (1981). Toxins of entomopathogenic fungi. In H. D. Burges (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant diseases 1970-1980* (pp. 441–464). London: Academic Press.
- Rombach, M. C. (1989). Producción of *Beauveria bassiana* [deuteromycotina. hyphomycetes] sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga*, 34(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/BF02372586>
- Rombach, M. C., Aguda, R. M., & Roberts, D. W. (1988). Storing dry *Beauveria bassiana* mycelium. *International Rice Research Newsletter*, 13, 37–38. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH19910024139>
- Rombach, M. C. (1989). Production of *Beauveria bassiana* [Deuteromycotina. Hyphomycetes] sympoduloconidia in submerged culture. *BioControl*, 34(1), 45–52.
- Ronco, A. E., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martín, M. L., Mugni, H., & C., B. (2008). Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the pampasic region. In J. Chen & C. Guô (Eds.), *Ecosystem Ecology Research Trends* (pp. 209–239). New York: Nova Science Publishers. Retrieved from https://books.google.es/books?id=AH9JghsCN0gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=pampasic&f=false
- Rondot, Y., & Reineke, A. (2016). Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis*

- vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.006>
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulia, G., Bandani, A. R., & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>
- Sánchez, L. E. (2002). Impactos sobre los ecosistemas. In F. L. Repetto & C. S. Karez (Eds.), *Ii Curso Internacional De Aspectos Geológicos De Protección Ambiental* (pp. 322–331). Montevideo, Uruguay: UNESCO. Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd29/impacto-ecosis.pdf>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schamne, P. A. (2010). *Effect of additives and Fishfertilquitosana® in solid media during conidia production of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin and Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin*. Universidade estadual do centro-oeste, UNICENTRO – PR.
- Secretaría Del Convenio Sobre la Diversidad. (2011). *Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Montreal, Canadá.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). (2017). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021* (1st ed.). Quito: Gobierno Nacional de la República del Ecuador. Retrieved from http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf
- Shimizu, S. (1993). Production of an extracellular protease by *Beauveria bassiana* in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, 291–294.
- Simmons, J. E., & Muñoz-Saba, Y. (2005). *Cuidado Manejo Y Conservacion De Colecciones Biológicas*. Bogotá D.C.: UNAL. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-A-211.1>
- Smith, D. (2014). Culture Collections. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.),

- Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., Vol. 1, pp. 251–253). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00366-1>
- Smithee, S., Tracy, S., Drescher, K. M., Pitz, L. A., & McDonald, T. (2014). A novel, broadly applicable approach to isolation of fungi in diverse growth media. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 155–161.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.023>
- Soper, R. S., & Ward, M. G. (1981). Production, formulation and application of fungi for insect control. *Biological Control in Crop Production*, 161–180.
- Spedalieri, G. (2006). Los objetivos del catálogo. *Información, Cultura y Sociedad: Revista Del Instituto de Investigaciones Bibliotecológicas*, (15), 51–69.
 Retrieved from <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=263019683004%0AInformación>,
- Srivastava, P., & Singh, A. (2013). In-vivo 13 study of effects of dithiocarbamates fungicide 14 (Mancozeb) and its metabolite ethylenethiourea 15 (ETU) on fresh water fish *Clarius batrachu*. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2), B228–B235.
 Retrieved from <http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/jbes/article/view/83>
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourment ang Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press (3rd ed., Vol. 2). Berkeley, California: Ten Speed Press. Retrieved from <https://goo.gl/5QzDMb>
- Stephen, D. (2003). Preventing pesticide poisonings in Ecuador. Ottawa: IDRC/CRDI.
 Retrieved from <https://www.idrc.ca/en/article/case-study-ecuador-preventing-pesticide-poisonings-ecuador>
- Strasser, H., Forer, A., & Schinner, F. (1997). Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. T.A. Jackson and T.R. Glare (Eds), *Proceedings of the 3rd International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests, February 21–23, 1996*. AgResearch Lincoln, New Zealand., 125–130.
- Subsecretaría de Tierras y Reforma Agraria [STRA]. (2016). Resolución 114. Quito, Ecuador: Gobierno de la república del Ecuador. Retrieved from <http://www.agricultura.gob.ec/acuerdos-ministeriales/>

- Sumpsi, J. M. (2011). La volatilidad de los mercados agrarios y la crisis alimentaria. *Reivsta Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 229, 11–35.
- Sumpsi, J. M. (2012a). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de Paz*, 106, 37–48.
- Sumpsi, J. M. (2012b). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de Paz*, 106, 37–48. Retrieved from <http://www.iesa.csic.es/eventos/071120110.pdf>
- Tao, P., Liu, H., & Xu, X. (2011). ITS sequence analysis of wild *Auricularia auricularia* strains from Heilongjiang Province. *Procedia Environmental Sciences*, 8(18), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.088>
- Tapia, C., Zambrano, E., & Montero, A. (2008). *Estado de los Recursos Filogenéticos para la Agricultura y Alimentación en el Ecuador. Publicación Miscelánea No. 114*. Quito.
- Taylor, D. L., & McCormick, M. K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177(4), 1020–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x>
- Taylor, P., & Feng, M. G. (1994). Biocontrol Science and Technology Production , formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control : current status Production , Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for, (April 2013), 37–41.
- Téllez-jurado, A., Guadalupe, M., Ramírez, C., & Flores, Y. M. (2007). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología.*, 30, 73–80.
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G., & Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(1), 12–20. <https://doi.org/doi:10.1139/m87-003>
- Toegel, S., Salar-Behzadi, S., Horaczek-Clausen, A., & Viernstein, H. (2010). Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization.

- Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 16–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.004>
- United Nations. (2017). General information. Retrieved from
<http://www.un.org/esa/earthsummit/>
- Universidad Nacional Abierta y a Distancia [UNAD]. (2001). Lección 13: Importancia de las enfermedades de los cultivos en el sector económico. Retrieved June 20, 2008, from
http://datateca.unad.edu.co/contenidos/30165/contenido_en_linea_exe/30165_FITOPATOLOGIA/exe_fitopatologia/leccin__13_importancia_de_las_enfermedades_de_los_cultivos__en_el_sector_economico.html
- Universidad Técnica Particular de Loja. (2016). Museo de Colecciones Biológicas de la UTPL.
- Valencia, R. A., Lobo, M., & Ligarreto, G. A. (2010). Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, 11(1), 85–94.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:198
- Valero-Jiménez, C. A., Wieggers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M., & van Kan, J. A. L. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>
- van Mil, H. G. J., Foegeding, E. A., Windhab, E. J., Perrot, N., & van der Linden, E. (2014). A complex system approach to address world challenges in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 20–32.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.005>
- Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Meena, V. S., Kumar, A., & Meena, R. S. (2015). Issues and challenges about sustainable agriculture production for management of natural resources to sustain soil fertility and health. *Journal of Cleaner Production*, 107, 793–794. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.130>
- Vieira, D. C., Noldin, J. A., Deschamps, F. C., & Resgalla, C. (2016). Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. *Chemosphere*, 162, 48–54.

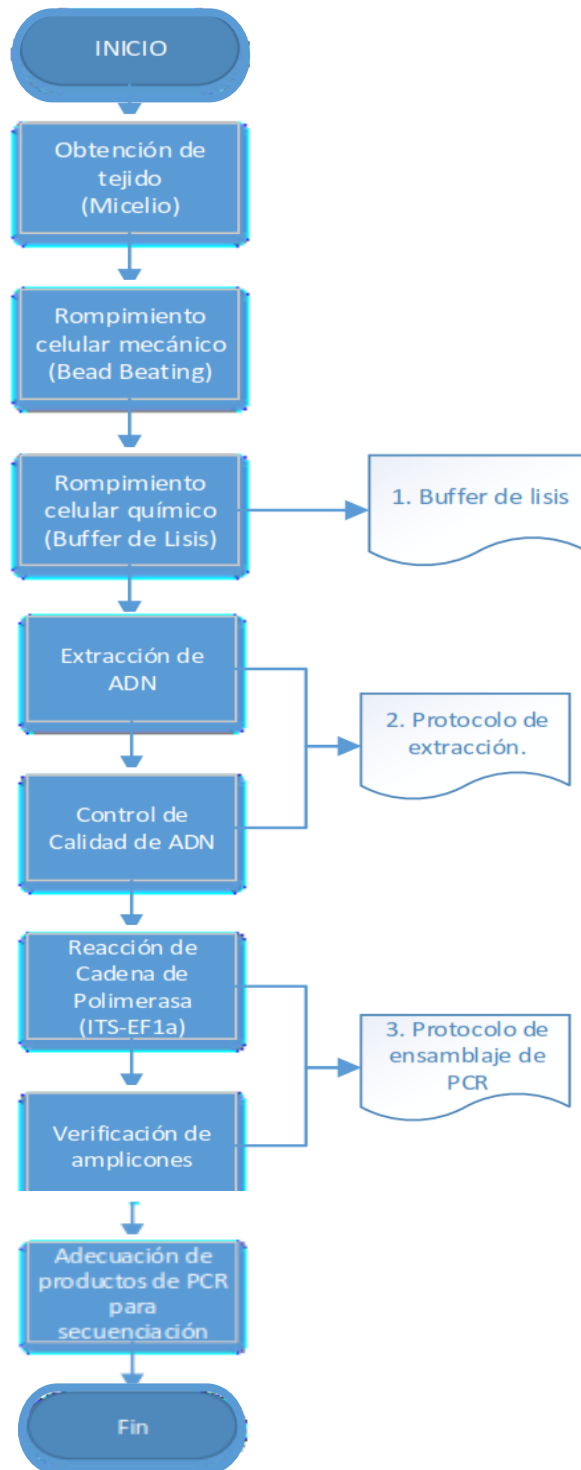
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.046>

- Voyron, S., Roussel, S., Munaut, F., Varese, G. C., Ginepro, M., Declerck, S., & Filipello Marchisio, V. (2009). Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia following different methods of preservation. *Mycological Research*, *113*(10), 1027–1038. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.06.006>
- Wagner, B. L., & Lewis, L. C. (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), 3468–3473. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3468-3473.2000>
- Weiser, J., Matha, V., Zizka, Z., & Jegorov, A. (1989). Pathology of cyclosporin A in mosquito larvae. *Cytobios*, *59*(238–239), 143–150. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2635649>
- White, J. F., Belanger, F., Meyer, W., Sullivan, R. F., Bischoff, J. F., & Lewis, E. a. (2002). Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes - Development of symbiotic interactions with plants. *Symbiosis*, *33*(3), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). New York: Academic Press Inc.
- Wilson, C., & Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics*, *39*(3), 449–462. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5)
- World Health Organization (WHO), & Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2010). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides*. Roma.
- Yin, F. M., Chen, Q. C., Chen, Y. G., Guo, G. I., & Li, Z. W. (1988a). Studies of Submerged Culture of *Beauveria bassiana* Conidia. *Study and Application of Entomogenous Fungi in China*, *1*, 105–110.
- Yin, F. M., Chen, Q. C., Chen, Y. G., Guo, G. L., & Li, Z. W. (1988b). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to cockroaches. In Y. W.

- Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 105–110). Beijing: Academic Periodical Press.
- Ying, S. H., & Feng, M. G. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 323–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02311.x>
- 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>

ANEXOS

Anexo 1. Proceso de extracción de ADN



Anexo 2. Ficha Técnica del Liofilizador

Liofilizadoras AdVantage Plus y AdVantage Bench Top con charola

Liofilizadora de charola y de conector múltiple en un paquete excepcional

- Características del modelo AdVantage Plus:**
- Potencialmente similar a la liofilizadora piloto más grande de investigación y desarrollo en un sistema de mesa más chico
 - Flexibilidad en el proceso por medio de un paquete de control integrado
 - Capacidad de tratar el producto por medio de recocido/térmicamente para mejorar los resultados de la liofilización
 - Hasta 12 segmentos programables en la etapa de liofilización
 - Flexibilidad para personalizar ciclos hasta con 16 segmentos programables de liofilización
 - Fácil acceso a programas usados con frecuencia los cuales pueden tener hasta 16 ciclos almacenados
 - Control de presión ajustable a través del ciclo y disponible en unidades de medida seleccionadas por el usuario en mT, uB y Pa
 - Monitoreo del progreso de liofilización más eficiente por medio de cuatro termopares en el producto
 - Capacidad del condensador: 6L. Temperatura del condensador: -85°C
 - Capacidad para tener hasta tres entrepaños de acero inoxidable
 - Entrepaño diseñado para ser cubierto por agua logrando una temperatura tan baja como -65°C; uniformidad de +/-1°C
 - Control de temperatura de -55 a 60°C
 - Disponible en su versión a granel o selladora
 - Comparación rápida en cuanto a la capacidad del entrepaño: hasta 1197 viales de 2ml (14.75mm de diámetro externo x 40mm de altura con tapón parcialmente colocado) utilizando los tres entrepaños



25 $\frac{3}{4}$ " W 65.4cm
28" D 71.1cm
28 $\frac{3}{4}$ " H 73.0cm

Control: Tipo Wizard

- Características del modelo AdVantage**
- Un gran avance a partir de una liofilizadora de conector múltiple en los casos en que se requiera procesar una mayor cantidad de producto a la vez o que se requiera un control de temperatura en el entrepaño
 - Entrepaños sólidos con cubierta de teflón
 - Sistema formado por un solo entrepaño
 - Desempeño del controlador similar al del modelo AdVantage Plus
 - Capacidad del condensador: 3.5L con un máximo de temperatura baja de -85°C
 - Temperatura del entrepaño tan baja como -70°C con control de -55 a 60°C
 - Comparación rápida en cuanto a la capacidad del entrepaño: hasta 399 viales de 2ml (14.75mm de diámetro externo x 40mm de altura con el tapón parcialmente colocado)

Control: Tipo Wizard

APLICACIONES TÍPICAS

- Liofilización en laboratorios de investigación y desarrollo
- Placas de 96 pozos
- Botellas de suero o viales
- Productos a granel para su análisis material vegetal, tejido orgánico, productos de desecho

AdVantage Plus (además de las características del modelo Advantage):

- Liofilización a pequeña escala de investigación y desarrollo

Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS FINAL.docx (D41522055)
Submitted: 9/17/2018 4:52:00 PM
Submitted By: velapablo1981@gmail.com
Significance: 7 %

Sources included in the report:

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA.docx (D35203207)
 TESIS MAESTRIA HUGO CASTRO (OCTUBRE) 2015 .docx (D15848307)
 PROY. INV. DEIVY GUEVARA DEIVY 12.09.2018.docx (D41387171)
 TESIS KEVIN ZAPATA.doc (D21344721)
<https://academic.oup.com/jinsectscience/article/17/2/53/3114325>
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800006
<https://www.amazon.fr/Beauveria-bassiana/s?page=1&rh=i:aps%252Ck:Beauveria%20bassiana>
<https://www.ajouronline.com/index.php/AJAFS/article/view/2554/0>
http://file.scirp.org/Html/1-2880022_46652.htm
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756205000225>
<http://eprints.uanl.mx/2707/1/1080227494.pdf>
<https://www.cambridge.org/core/journals/memoirs-of-the-entomological-society-of-canada/article/div-classtitledevelopment-of-span-classitalicbeauveria-bassianaspan-for-control-of-grasshoppers-and-locustsdiv/752DDF613753D1978DA4DED337B6C152>
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-31952011000800006&lng=pt
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1214598/>
http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2003/BP03.pdf
https://es.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana
<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/008524-0>
<https://eurekamag.com/research/002/678/002678708.php>
https://jbiocontrol.ut.ac.ir/article_62738_en.html
<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a09.pdf>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5427670/>
<http://edepot.wur.nl/385465>
<http://www.accionecologica.org/editoriales/1708-el-protocolo-de-nagoya-la-mercantilizacion-de-la-biodiversidad-y-los-conocimientos-tradicionales>
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
<https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150454>
<https://doi.org/10.1017/S2078633610000998>
<http://www.jstor.org/stable/1243670>
<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a06.pdf>

<https://doi.org/10.1542/peds.2005-1781>
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19830883357>
http://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/4490/S018664_es.pdf?sequence=1
<https://www.researchgate.net/project/Banco-ecuadoriano-de-recursos-genetico-microbianos-para-la-industria-enzimatica>
<https://doi.org/10.1039/C6RA25859J>
<http://www.bdigital.unal.edu.co/53469/>
<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd29/impacto-ecosis.pdf>
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
<http://www.iesa.csic.es/eventos/071120110.pdf>

Instances where selected sources appear:

79

