

Cepa nativa ecuatoriana de *Beauveria bassiana* con potencial industrial

Native Ecuadorian strain of *Beauveria bassiana* with industrial potential

Pablo Roberto Vela Núñez¹, Julio Amilcar Pineda Insuasti², Astrid Stefanía Duarte Trujillo³, Claudia Patricia Soto Arroyave⁴, Camilo Alejandro Pineda Soto⁵

¹ Universidad Técnica del Norte (UTN), Ibarra, Ecuador.

² Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

³ Universidad de los Llanos (UNILLANOS), Villavicencio, Colombia.

⁴ Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Colombia.

⁵ Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: velapablo1981@gmail.com

Recibido: octubre 12 de 2017

Aceptado: diciembre 15 de 2017

RESUMEN

Beauveria spp. es un mohó cosmopolita usualmente empleado como biocontrolador en cultivos agrícolas debido a su actividad antagonista hacia insectos fitopatógenos. Este experimento tiene como objetivo seleccionar el mejor medio de cultivo para el cultivo in vitro de la cepa nativa del hongo *Beauveria bassiana* mediante el cálculo de la tasa de crecimiento radial. Se aisló, identificó molecularmente y caracterizó químicamente las cepas nativas procedentes de suelo de cafetal, luego se evaluó el crecimiento en diferentes medios. Se obtuvieron cepas puras con calidad del 99%, identidad genética del 100%, composición química rica en proteínas y minerales, y velocidad de crecimiento radial promedio de 6,4 mm/día en medio MEA, que mostró diferencias significativas con PDA.

PALABRAS CLAVE: aislamiento, caracterización control biológico, tasa de crecimiento.

ABSTRACT

Beauveria spp. is a cosmopolitan mold usually used as a biocontroller in agricultural crops due to its antagonistic activity against phytopathogenic insects. This experiment aims to select the better culture medium for the in vitro cultivation of the native strain of the fungus *Beauveria bassiana* by calculating the radial growth rate. The native strains of the soil from a coffee plantation was isolated, molecularly identified and chemically characterized, then the growth rate was evaluated. Pure strains of *B. bassiana* were obtained with quality of 99%, genetic identity of 100%, chemical composition rich in proteins and minerals, and radial growth rate of 6.4 mm /day in MEA medium, which has statistically significant differences with PDA.

KEYWORDS: isolation, characterization, biological control, growth rate.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es 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). El Estado ecuatoriano reconoce a la biodiversidad como una ventaja comparativa para el desarrollo científico de las industrias

El aprovechamiento sostenible de la biodiversidad y su potencial industrial constituye una oportunidad para promover la conservación de las áreas naturales, incentivar la investigación científica, impulsar proyectos biotecnológicos, fomentar y proteger los conocimientos tradicionales, crear normas que permitan un comercio justo de las especies útiles y/o sus productos derivados, y a la larga favorecer el crecimiento de los indicadores económicos nacionales (Granizo y Rios, 2011).

El desarrollo de bioinsumos constituye una forma de valorización de la biodiversidad a través de la biotecnología, permitiendo su aprovechamiento sostenible (Quezada, Roca, Szauer, Gómez, y López, 2005; Ramón *et al.*, 2005). Los bioinsumos pueden dividirse en biofertilizantes y biocontroladores, aunque a veces la misma cepa microbiana posee ambas funciones (Nora Altier, Elena Beyhaut, 2012).

Beauveria spp. es un hongo cosmopolita de gran importancia como modelo para el estudio de entomopatogénesis y como biocontrolador de insectos plaga (Rehner y Buckley, 2005), dentro de los cuales se destacan: el escarabajo de la patata de Colorado, *Lepitnotarsa decemlineata* (Allee, Goettel, Gol'berg, Whitney, y Roberts, 1990); la hormiga roja de fuego, *Solenopsis invicta* Burenk (Bradleighvinson y Siebeneicher, 1991); la oruga de pino, *Dendrolimus Punctata* Walker (Long y Du, 1988); la cucaracha alemana, *Blattella germánica* (Cai y Liu, 1988); el barrenador menor, *Elasmopalpus hgnosellus* (McDowell, Funderburk, Boucias, Gilreath, y Lynch, 1990); el gusano falso medidor, *Trichoplusia ni* (Ignoffo, García, Kroha, y Crouch, 1982); el gusano de seda de mora, *Bombyx mori* (Huang, 1988); el saltamontes migratorio, *Melanoplus sanguinipes* (Feng, 1994) y piojo harinoso, *Planococcus ficus* (Rondot y Reineke, 2018). Además, este hongo

química, farmacéutica y alimenticia, con el fin de viabilizar su uso soberano, estratégico y sustentable (Senplades, 2017).

tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal, directamente al facilitar la absorción de nutrientes por la planta (Gómez-Vidal, Salinas, Tena, y Lopez-Llorca, 2009).

Bajo este contexto, el propósito de este trabajo es seleccionar el mejor medio de cultivo para el cultivo in vitro de la cepa nativa del hongo *Beauveria bassiana* mediante el cálculo de la tasa de crecimiento radial para tener una idea de su potencial industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

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).

Material biológico

Las muestras de suelo y de granos de café arábica fueron recolectados 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. La plantación 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 se realizaron en forma de zig-zag, cerca de las raíces de la planta café, a una profundidad de 20 cm, conforme con Cubillos, Goretti y Lizcano (2014).

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* sp. fueron purificadas mediante la técnica de repiques sucesivos en agar PDA, teniendo en cuenta las claves taxonómicas de Humber (1997). Las

cepas puras se codificaron como *ceba BB-30u* y *ceba BB-20u*, y se conservaron a una temperatura de 2 a 4 °C en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos (BRGM) del CEBA.

Identificación

Se realizó en el laboratorio especializado IDGEN. La identificación molecular tuvo el siguiente protocolo: extracción de ADN mediante el método de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989), eliminación del ARN residual con ARNasa (X. Z. Fan, Zhou, Xiao, Xu, y Bian, 2014); amplificación de barcode con ITS1 e ITS4 como cebadores (primers); secuenciación estándar por el Método de Sanger, Nicklen y Coulson (1977); ensamblaje de productos de PCR empleando el programa bioinformático GENEIOUS; y contraste de resultados con las secuencias registradas en la base de datos GenBank.

Caracterización química

Se realizó en el laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP. 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 carpóforos de *B. bassiana* previamente limpiados y desinfectados.

Cálculo de la velocidad de crecimiento

Cajas de Petri que contenían los medios de cultivo en estudio (PDA y MEA) fueron inoculadas con plugs (tacos de agar con micelio) provenientes de las cepas de reserva del CEBA, se incubaron a 22 °C durante 6 días y se codificaron como *H001*. La ecuación (1) permitió calcular la velocidad de crecimiento (V) como el cociente entre el diámetro de la colonia (x) y el tiempo de incubación (t) (Pineda, Soto, Santiago, Ponce, y Reyes, 2015).

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

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 en el tiempo.

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.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento

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. El reverso presentó un color amarillo ligero (ver fig. 1). Se coincidió con las observaciones de Echeverría-Beirute (2006) y de Cajas-Suárez (2012). Se observa también que en el medio MEA hay mayor cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), pero menor densidad de micelio por colonia en contraste con el medio PDA.

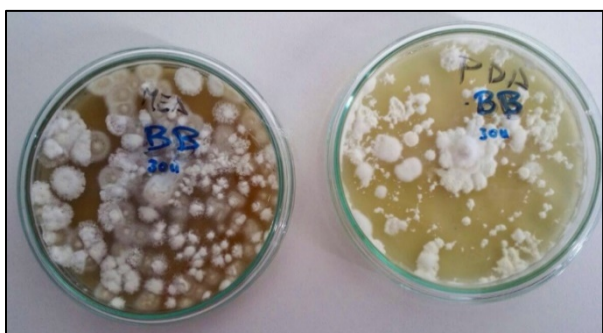


Fig. 1. Colonias de *Beauveria* sp. nativo.

El aislamiento de las cepas se realizó en agar antibiótico y la purificación en agar MEA coincidiendo con Galarza (2011), aunque otros autores reportan también el uso de otros medios de cultivo selectivos a base de cloruro de cobre, cristal violeta y benzoato de sodio (Archuleta-Torres, García-Gutiérrez, Ruelas, Gaxiola-Castro, y López, 2012); Agar Rosa de Bengala y Agar Sabouraud (Cubillos *et al.*, 2014); PDA más peptona (Ramos-Delgado, 2016), Agar Papa Sacarosa (PSA, por sus siglas en inglés) (García, Villamizar, Torres, y Cotes, 2006), PDA más oxitetraciclina (Echeverría Beirute, 2006).

La incubación de la cepa en el experimento se realizó a 22 °C durante siete días, mientras otros autores reportan incubaciones a 25 °C durante 5 a 7 días (Cubillos *et al.*, 2014), 25 °C durante 15 a 21 días (Echeverría Beirute, 2006), 24 °C durante 8 días (García *et al.*, 2006), 23 a 27 °C durante 14 a 21 días

(Gandarilla-Pacheco, Galán-Wong, Arévalo-Niño, Elías-Santos, y Quintero-Zapata, 2013), 26 °C durante 25 a 30 días (Ramos Delgado, 2016), 25 °C durante 15 días (Cajas-Suárez, 2012), 24 a 28 °C durante 4 a 6 días (Monzón, 2000).

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, y 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 y 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 o por debajo del nivel de género (Dunham, O'dell, y Molina, 2003).

El ADN lineal de H001 tuvo una longitud de 600 pb, una calidad del 99,4% y una identidad genética del 100% con la secuencia de nucleótidos *B. bassiana*, registrada en la accesión número KY471654.1 de la base de datos de nucleótidos de GenBank (GenBank, 2017).

El tamaño de banda de los amplicones obtenidos coincidió con los resultados de Montesinos y colaboradores (2011). Por el contrario, Echeverría Beirute (2006) obtuvo diferentes patrones de bandas de variable intensidad y alta reproducibilidad, comparándose con los locus Ba01 a Ba13 de GenBank. Lo anterior puede deberse a que los

investigadores emplearon un marcador de peso molecular de 300 a 700 pares de bases, en contraste con este trabajo que empleó un marcador de 1000 pb.

La comparación de los amplicones de ADN de *H001* con el marcador de peso molecular de 1000 pb por electroforesis en gel de agarosa 1% se visualiza en la fig. 2; donde M es el marcador de peso molecular, C+ es el control positivo y C- es el control negativo.

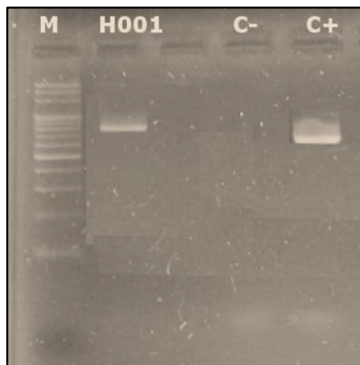


Fig. 2. Amplicón del fragmento ITS de *H001*.

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 18 accesiones de CENICAFÉ desde *B.bassiana* IBL 03043 a *B. bassiana* AY 334539. Bravo y colaboradores (2016) también alcanzaron un porcentaje de identidad alto, correspondiente al 97%, comparando sus amplicones con la secuencia de la accesión JX270638.1 97. Se coincidió también con la identificación realizada por Loc y colaboradores (2011); Alvarado y Rivera, (2016); Hguang y colaboradores (2015).

Montesinos-Matías y colaboradores (2011), emplearon los cebadores ITS 4 e ITS 5 y alcanzaron un porcentaje de similitud genética de más del 99% con *Cordyceps bassiana* y *B. bassiana* (número de acceso GenBank es HM189220); por lo que se consideró que *B. bassiana* es la fase asexual de *Cordyceps bassiana*.

Caracterización

La fig. 3 y la tabla 1 muestran los resultados del análisis bromatológico en base seca.

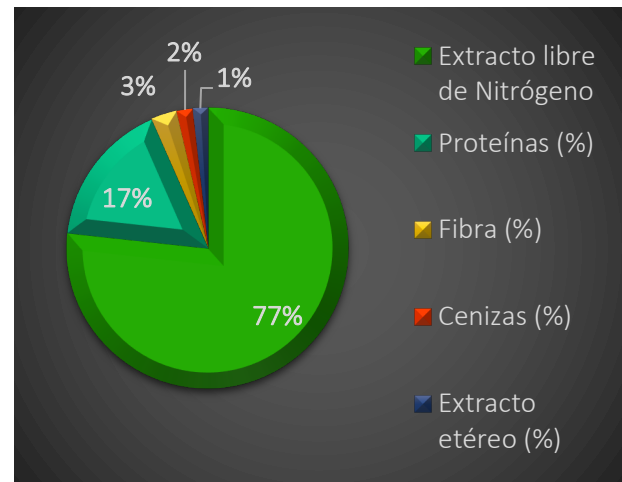


Fig. 3. Contenido nutricional de *B. bassiana*

Tabla 1. Contenido de minerales por elemento

| Elemento | Unidad | Valor |
|----------|--------|-------|
| 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 |

No se encuentra en la literatura análisis proximales relevantes efectuados al hongo *B. bassiana*, probablemente porque sus aplicaciones no están relacionadas con la industria alimentaria a causa de su alto contenido de toxinas. Sin embargo, se reporta el análisis de sus metabolitos secundarios por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) y Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR, por sus siglas en inglés), donde se cuantificó el contenido de alcoholes, fenoles, alcanos, alquenos, nitrilos, compuestos aromáticos, ácidos carboxílicos, aminas alifáticas, aminas primarias y cetonas (Ragavendran, Dubey, y Natarajan, 2017).

Velocidad de crecimiento

La velocidad promedio en MEA fue de 6,4 mm/d con un mínimo de 6,0 mm/d, un máximo de 6,7 mm/d, desviación estándar de 0,2530, coeficiente de variación de 0,0395, sesgo de -0,5559 y curtosis de -0,0830. La velocidad promedio en PDA fue de 5,18 mm/d, con un mínimo de 5,0 mm/d, un máximo de 5,5 mm/d, desviación estándar de 0,2229, coeficiente de variación de 0,0430, sesgo de 0,6354 y curtosis de -0,9047.

Se observa que los datos por grupos presentan una dispersión muy semejante, con una variación de aproximadamente el 4%, aunque el rango en el nivel MEA es 0,2 unidades mayor. Los valores de curtosis muestran que ambos grupos 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, que al operarse da 0,0624, un valor no muy alejado del correspondiente a la distribución normal, que es cero.

La prueba de Shapiro-Wilk arrojó un valor P de 0,06551 que confirma que los datos muestrales provienen de una población con distribución normal. La prueba de Jarque-Bera dio un valor P de 0,5063 que demuestra que los datos tienen la asimetría y la curtosis de una distribución normal. La prueba de Levene suministró un valor Pr de 0,8284 que comprueba que las varianzas poblacionales son iguales.

El ANOVA arrojó un valor P de $4.86e^{-06}$ y una razón F de 78,14, que evidencian que existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de la velocidad de crecimiento lineal de un medio de cultivo y otro.

García, Villamizar, Torres y Cotes (2006) reportaron en medio Papa Sacarosa Agar (PSA) velocidades de crecimiento un poco inferiores, correspondientes a 6,5 mm/d en un periodo de 5 días y de 5,9 mm/d para un periodo de 8

días. Por el contrario, Echeverría-Beirute (2006) obtuvo velocidades de crecimiento promedio demasiado bajas, que variaron entre 0,68 y 2,43 mm/d sin perder la conducta lineal; del mismo modo que Vélez y colaboradores (2001), cuyas tasas de crecimiento oscilaron entre el 0,18 a 0,37%; y que Malpartida-Zevallos, Narrea-Cango y Dale-Larraburre (2013), quienes obtuvieron tasas de crecimiento promedio de 3,45 mm/d.

Los resultados acerca del mejor medio de cultivo para la propagación in vitro de *B. bassiana* discrepan con los resultados de Luque (1989), quien afirma que el mejor medio es PDA, aunque este autor realizó el estudio con otro hongo, *Diplodia mutila*.

Un estudio realizado en *Sclerotium rolfsii* mostró que el medio MEA es el que permite la mayor producción de esclerocios y la mejor diferenciación de variantes morfológicas, aunque conlleva a una menor velocidad de crecimiento micelial, coincidiendo con Luque (1989) (Hernández et al., 2004).

El medio de cultivo óptimo varía dependiendo de las investigaciones, ya que todas trabajan con diferentes parámetros de operación, sin embargo, lo que sí está comprobado es que la composición del medio de cultivo tiene influencia estadísticamente significativa sobre la velocidad de crecimiento de *B. bassiana* (Safavi et al., 2007). Aunque, un estudio demostró que la sacarosa es la fuente de carbono más adecuada para la producción de biomasa mientras la glucosa es más adecuada para la producción de esporas; por otro lado, el sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno que permite la mayor producción de biomasa mientras el nitrito de sodio es mejor inductor de la producción de esporas (Mishra y Malik, 2013).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron cepas puras de *Beauveria* sp. procedentes de suelo de cafetal y granos de café arábica, las cuales mostraron identidad

genética del 100% con *B. bassiana* y un contenido nutricional rico en proteínas y minerales como fósforo, calcio y potasio. El medio de cultivo más apropiado para su

crecimiento in vitro es el medio MEA, ya que mostró diferencias estadísticamente significativas con el medio PDA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allee, L. L., Goettel, M. S., Gol'berg, A., Whitney, H. S., y 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>
- Alvarado, L., y 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/10.1590/18069657rbc20150454>
- Archuleta-Torres, A., García-Gutiérrez, C., Ruelas, R. D., Gaxiola-Castro, L. A., y López, M. Á. (2012). Aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con medio selectivo y pruebas de toxicidad contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. *Revista Entomología Mexicana*, 11(1), 266–269. <http://www.entomologia.socmexent.org/revista/entomologia/2012/CB/266-269.pdf>
- Bradleighvinson, S., y 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. Recuperado a partir de [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90133-0)
- Bravo, V., Ronquillo, M., Martínez, M., y Quezada, G. (2016). Efecto enraizador de *Trichoderma asperellum* en el cultivo de palma aceitera. *Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana*, 4, Número especial de suelos, 20–27. Recuperado a partir de <http://www.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/view/42>
- Cai, B. L., y Liu, A. X. (1988). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to cockroaches. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, y 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. entomopatígeno de Hypothenemus hampei*. Universidad Técnica Particular de Loja. Recuperado a partir de <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/7742/1/1008077.pdf>
- Cubillos, C., Goretti, M., y Lizcano, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la angostura de campoalegre (Huila). *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 1(1), 15–20. Recuperado a partir de <http://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/145>
- Dunham, S. M., O'dell, T. E., y 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 entomopatígeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Recuperado a partir de <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/463/Trabajo%20Final%20de%20Graduacion%20Biblioteca.pdf?sequence=1>
- 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. Recuperado a partir de

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159409355309>

- Galarza, L. L. (2011). *Aislamiento e identificación molecular de Trichoderma spp.* Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Recuperado a partir de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/30239>
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Galán-Wong, L. J., Arévalo-Niño, K., Elías-Santos, M., y Quintero-Zapata, I. (2013). Evaluación de aislados nativos Mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: *Cordycipitaceae*) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255–266. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000300005
- García, M. X., Villamizar, L. F., Torres, L. A., y Cotes, A. M. (2006). *B. bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 77, 50–56. Recuperado a partir de <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6119>
- 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. Accesion. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY471654.1>.
- Gómez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., y 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., y Jiménez, J. N. (2014). Colecciones microbianas : Importancia , establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*, 4(1), 23–33. Recuperado a partir de <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v18n1/vac04109.pdf>
- Granizo, T., y Rios, M. (2011). Aprovechamiento económico del bioconocimiento, los recursos genéticos, las especies y las funciones ecosistémicas en el Ecuador. Quito: Ministerio Coordinador de Patrimonio. Institute For Tropical Ecology and Conservation. Recuperado a partir de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/4341>
- Huang, Y., Mijiti, G., Wang, Z., Yu, W., Fan, H., Zhang, R., y 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. Recuperado a partir de [10.1016 / j.micres.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.004)
- Huang, Y. X. (1988). Experiment on the virulence of *Beauveria bassiana* to *Bombyx mori* in different culture stage. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, y 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. En *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 269–280. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50015-4>
- Ignoffo, C. M., García, C., Kroha, M., y Crouch, T. L. (1982). Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology*, 75(2), 275–276. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1093/jee/75.2.275>
- 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., y Du, K. H. (1988). Study on the pathogenic mechanism of *Beauveria bassiana* to the Masson's pine caterpillar. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, y Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 80–82). Beijing: Academic Periodical Press.
- McDowell, J. M., Funderburk, J. E., Boucias, D. G., Gilreath, M. E., y Lynch, R. E. (1990). Biological activity of *Beauveria bassiana* against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: *Pyrilidae*) on leaf substrates and soil. *Environmental Entomology*, 19, 137–141. Recuperado a partir de

<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9030096>

- Montesinos-Matías, R., Viniestra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Gallardo-Escamilla, F., y 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. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000800006
- Monzón, A. (2000). Producción de hongos entomopatógenos. En *Producción y uso de hongos entomopatógenos* (pp. 10–35). Managua: FUNICA. Recuperado a partir de <http://funica.org.ni/index/biblioteca/resultados-de-investigacion/category/85-Bioplaguicidas.html?download=436:Produccion%20y%20uso%20hongos>
- Nora Altier, Elena Beyhaut, M. R. y F. R. (2012). Plataforma de bioinsumos de uso agrícola en base a microorganismos benéficos. *INIA*, (29), 47–50. Recuperado a partir de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/18429300612191129.pdf>
- Pineda, J. A., Soto, C. P., Santiago, N. F., Ponce, C. A., y Reyes, G. (2015). Selección de cepas nativas ecuatorianas del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) con fines industriales. *Bionatura*, 1(1), 29–32. Recuperado a partir de <https://goo.gl/aePL6d>
- Quezada, F., Roca, W., Szauer, M. T., Gómez, J. J., y López, R. (2005). *Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad: Capacidades locales y mercados potenciales*. Caracas: CAF. Recuperado a partir de <http://publicaciones.caf.com/media/1275/99.pdf>
- Ragavendran, C., Dubey, N. K., y 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>
- Ramón, D., Morán, M., Costa, J., López, F., Arriola, A., Martín, A., ... Rodríguez, F. (2005). Biotecnología en el Sector Alimentario. *Genoma España*, 5(2), 1–81. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- 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. Recuperado a partir de <http://www.bdigital.unal.edu.co/53469/>
- Rondot, Y., y Reineke, A. (2018). Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*, 116, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.006>
- Sanger, F., Nicklen, S., y 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>
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES). (2017). Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021 (1ª ed.). Quito: Gobierno Nacional de la República del Ecuador. Recuperado a partir de http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_OK.compressed1.pdf
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press (3ª ed., Vol. 2). Berkeley, California: Ten Speed Press. Recuperado a partir de <https://goo.gl/5QzDMb>
- Tao, P., Liu, H., y 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>