

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICÓTICO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Dendropsophus columbianus* (Hylidae) CONTRA DOS HONGOS *Hemileia vastatrix* y *Beauveria bassiana***



**ADRIANA LUCIA CUASAPUD ARTEAGA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN-CAUCA**

**2016**

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICÓTICO DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Dendropsophus columbianus* (Hylidae) CONTRA DOS HONGOS *Hemileia vastatrix* y *Beauveria bassiana***

**ADRIANA LUCIA CUASAPUD ARTEAGA**

**Proyecto de trabajo de grado para optar al título de Bióloga.**

**Director:**

**Jimmy Alexander Guerrero Vargas., Ph. D.**

**Asesores:**

**Clara Inés Giraldo Aristizabal., M. Sc.**

**Álvaro León Gaitán Bustamante., Ph. D.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**POPAYÁN-CAUCA**

**2016**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	10
1. JUSTIFICACION.....	11
2. MARCO TEORICO.....	12
2.1. Anfibios: .....	12
2.2. Generalidades de <i>Dendropsophus columbianus</i> ( Boettger, 1892): .....	12
2.3. Secreción cutánea y Piel de los anfibios: .....	14
2.4. Hongos:.....	14
2.5. Generalidades de <i>Hemileia vastatrix</i> (Berkeley & Broome):.....	16
2.5.1. Ciclo de infección:.....	16
2.5.2. Síntomas de la enfermedad:.....	17
2.6. Generalidades de <i>Beauveria bassiana</i> (Collier <i>et al.</i> 1998):.....	17
2.6.1. Ciclo de infección:.....	17
3. ANTECEDENTES .....	19
4. OBJETIVOS .....	22
4.1. Objetivo General:.....	22
4.1.1. Objetivos Específicos: .....	22
5. MATERIALES Y METODOS .....	23
5.1. Colecta de <i>D. columbianus</i> : .....	23
La captura <i>D. columbianus</i> se realizó por búsqueda libre y sin restricciones siguiendo las vocalizaciones emitidas por los machos, entre las 19:00 y 22:00 horas cuando presentan mayor actividad dentro del humedal ubicado en el sector de Las Guacas, municipio de Popayán.....	23
5.2. Extracción de la secreción cutánea por estimulación eléctrica: .....	23
5.3. Cultivo de Hongos:.....	23
5.3.1. recolección de esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> :.....	23
5.3.2. Cultivo de esporas para <i>Beauveria bassiana</i> :.....	23
5.4. Diseño experimental:.....	24

5.4.1. Tratamientos experimentales de secreción cutánea .....	24
.....	26
5.4.2. Porcentaje de germinación de esporas: .....	27
5.4.3. Variación.....	27
5.4. Análisis estadístico: .....	27
6. RESULTADOS .....	28
6.1. Porcentaje de germinación de esporas .....	28
6.1.1. Prueba de Germinación de esporas de <i>Hemileia vastatrix</i> .....	28
Tabla 1. Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de student-newman keuls para evaluar la diferencia entre tratamientos.....	28
7. DISCUSIÓN .....	34
8. CONCLUSIONES.....	36
9. RECOMENDACIONES.....	37
10. BIBLIOGRAFIA.....	38

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplar adulto de <i>D. columbianus</i> , colectado en el sector de las Guacas- Municipio de Popayán. Foto por : Adriana Lucia Cuasapud.....	12
Figura 2: Distribución de <i>D. columbianus</i> en Colombia. Tomada de © 2013-2015 BATRACHIA. TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS Mantenido y actualizada por Andrés R. Acosta- Daniel Cuentas.....	13
Figura 3: Representación de la pared celular fúngica. Los principales componentes de la pared celular fúngica son quitina, glucanos y glicoproteínas. Tomada de The structure and synthesis of the fungal cell wall, S. Bowman et al.....	16
Figura 4. Proceso de cultivo y fijación de <i>B. bassiana</i> a. Sepas de <i>B. bassiana</i> en incubadora. b. Diluciones para siembra. c. aplicación de tratamientos. d. fijación y corte e. Placas con tratamientos fijados para conteo.....	25
Figura 5.: Proceso de extracción de secreción Cutánea. a. Estimulación eléctrica b. Lavado a presión c. Raspado de secreción d.solución de agua y secreción ultracongelada en Nitrógeno Líquido y Liofilización.....	26
Figura 6. Porcentaje de germinación de <i>H. vastatrix</i> .....	29
Figura 7: Porcentaje de germinación de <i>B. bassiana</i> .....	29
Figura 8: Estructuras germinales de <i>H. vastatrix</i> a. control de esporas en agua, b. tratamiento 1 de 0.75 mg/ml, c. tratamiento 2 de 0.50 mg/ml. Fotografías por Adriana Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR), marca Nikon- modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X.....	30
Figura 9: Estructuras germinales de <i>H. vastatrix</i> a. control de esporas en agua, b. tratamiento 3 de 0.25 mg/ml, c. tratamiento 4 de 0.125 mg/ml. Fotografías por Adriana	

Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-  
modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X..... 31

**Figura 10:** Estructuras germinales de *B. bassiana* a. control de esporas en agua, b.  
tratamiento 1 de 0.75 mg/ml, c. tratamiento 2 de 0.50 mg/ml. Fotografías por Adriana

Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-  
modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X..... 32

**Figura 11:** Estructuras germinales de *B. bassiana* a. control de esporas en agua, b.  
tratamiento 3 de 0.25 mg/ml, c. tratamiento 4 de 0.125 mg/ml. Fotografías por Adriana

Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-  
modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X..... 33

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Universidad del Cauca por la formación profesional y humana que me brindó a lo largo de mi carrera en sus diferentes espacios, de igual manera a las dependencias que participaron parte de este proyecto como el Laboratorio de biología en donde se llevaron a cabo los cultivos de hongos y a la Unidad de Microscopía Electrónica en la que se hicieron las fotografías de las muestras obtenidas a partir de la aplicación de tratamientos. Agradezco también la colaboración y participación del Centro de Investigaciones Nacionales del Café (CENICAFÉ) y su departamento de Fitopatología en donde hice un entrenamiento previo a la fase experimental para manejar los métodos de cultivo y replicación de los hongos entomopatógenos y fitopatógenos.

Dentro de mi formación como investigadora el apoyo de grupos como GEMAVIC - Grupo de Estudios en Manejo de Vida Silvestre y Conservación, del cual soy integrante y el GIHT- Grupo de investigaciones herpetológicas y toxinológicas, pues me brindaron capacitación y formación en las áreas de la biología que cada uno estudia.

Para mi grupo de asesores guardo gratitud por el conocimiento y enseñanzas compartidas durante este tiempo, al profesor Jimmy Guerrero a quien admiro mucho por su gran disciplina y constancia, a la profesora Clara Giraldo que pacientemente me asesoró en la parte de manejo de cultivos y al Doctor Álvaro Gaitán quien de manera muy amable me enseñó el manejo que le dan a los hongos en sus laboratorios.

Mis compañeros, mis amigos y ya en poco mis colegas me regalaron grandes momentos que atesoro en mi corazón. Dayana Galindez, Jorge Becoche, Ana Maria Maya, Rafael Camayo, Miyer Galvez, Paola Arciniegas, Jhon Melendez, Patricia Mosquer, Clandia, Gilmar Melissa Portela, Gustavo Pisso, Yuranny Perafán, David Malfitano, Elena Triana y Angelica Salazar que me enseñaron a compartir y a disfrutar de las cosas sencillas que guarda la amistad, que me impulsaron a seguir en este bello camino.

Para mis Padres y mi Hermanita, que son el mejor regalo de la vida, porque siempre creyeron en mi, porque estuvieron a mi lado incondicionalmente y porque en cada paso que doy y a donde voy los llevo conmigo, infinitas gracias.

Y finalmente a todos aquellos que compartieron camino conmigo. Gracias!!

## RESUMEN

Colombia es el segundo país con mayor diversidad de anfibios, con especies endémicas y con un potencial toxinológico a investigar, como *Dendropsophus columbianus* que es una especie endémica de Hylido presente en los bosques de la región Andina. Los anuros generan una secreción cutánea como mecanismo de defensa que los protege de microorganismos patógenos propios de los ambientes en los que habitan, está constituida por aminas bioactivas, esteroides, alcaloides y péptidos, con un sin número de actividades biológicas como antitumoral, hemolítica, alucinógena y antimicrobiana. Por lo anterior, el objetivo principal de este proyecto fue determinar el potencial antifúngico de la secreción cutánea de *D. columbianus* en dos especies de hongos: *Hemileia vastatrix* que produce la enfermedad de la Roya y que es la patología con mayor impacto negativo en los cultivos de café y *Beauveria bassiana* hongo entomopatógeno utilizado como control biológico para contrarrestar el crecimiento de la Broca (*Hypothenemus hampei*) otra plaga del café. La secreción cutánea de *D. columbianus* inhibe el crecimiento de *H. vastatrix*, pero no el de *B. bassiana*, hecho importante que contribuye con la búsqueda de antimicóticos naturales.

## INTRODUCCIÓN

En el planeta existen 7389 especies de anfibios. Colombia con 767 especies ocupa el segundo puesto a nivel mundial, de estas, 336 son endémicas y 208 están en estado de amenaza (1)(2)(3)(4). Los anfibios poseen una piel lisa y húmeda provista de glándulas epidérmicas como las mucosas que lubrican e intervienen en el intercambio gaseoso y las granulosas o serosas que generan veneno y secreciones de protección, distribuidas por todo el cuerpo siendo más abundantes en las extremidades y el dorso (5). Los anfibios han desarrollado defensas inmunitarias para hacer frente a una variedad microorganismos que se encuentran compartiendo sus hábitats, generando secreciones compuestas de moléculas biológicamente activas como aminas, alcaloides y péptidos, entre las que se destacan estos últimos con potencial de desarrollo en agentes anti-infecciosos de valor terapéutico (6)(7)(8).

Esta capacidad de sintetizar compuestos naturales biológicamente activos, hace que la secreción cutánea de los anfibios sea una posible solución al problema que generan enfermedades que atacan los cultivos agrícolas. En Colombia las plagas representan un factor limitante en el proceso de producción del café, generan pérdidas que causan bajo rendimiento y mala calidad del producto; en los periodos de lluvias excesivas proliferan la roya (*H. vastatrix*), el mal rosado y la gotera; y en sequías excesivas, ocurre defoliación de la planta y se incrementa el ataque de araña roja, el minador y la Broca (*Hypothenemus hampei*) (9).

Este trabajo evaluó la actividad antimicrobiana de la secreción cutánea de *D. columbianus* sobre las esporas de *H. vastatrix* y *B. bassiana*, y como resultado final se encontró un efecto antifúngico en la primera etapa del ciclo infeccioso en la cual se inhibe el crecimiento del tubo germinal, con esto damos paso a otros estudios necesarios en el campo de la bioprospección.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre las enfermedades con mayor importancia que afectan los cultivos de café están la Roya (*H. vastatrix*) y la Broca (*H. hampeies*), *H. vastatrix* causa defoliación disminuyendo la producción del grano y conduciendo a la muerte de la planta (10,11). Por ser el principal problema patológico en los cultivos de café colombianos, se han probado microorganismos como control biológico, extractos de plantas y agentes inductores de resistencia, pero hasta el momento no se ha contado con éxito (12). Para la broca (*H. hampeies*), la cual genera pérdidas significativas en la producción del grano; el uso de insecticidas ha demostrado poca eficacia de control frente a este problema, generando contaminación y afectando otras estructuras de la planta, otra alternativa es el control biológico con el hongo *B. bassiana*, siendo más eficaz que los insecticidas convencionales (13)(14).

Por esta razón se investigó en alternativas que no generen daño al ambiente y sean efectivas para el control de patógenos. Una opción es la identificación del potencial toxinológico benéfico de venenos y secreciones repulsivas que producen algunos animales, en el caso de los anfibios los cuales son generadores de secreciones ricas en moléculas biológicamente activas (15,16). El anuro *D. columbianus* presente en ambientes conservados y altamente intervenidos tiene moléculas en su secreción cutánea que lo protegen de parásitos y hongos infecciosos. Se buscó identificar el potencial antimicótico de la secreción cutánea contra *H. vastatrix* sin que se afecte el crecimiento de *B. bassiana*, generando una nueva alternativa de control para esta enfermedad en el café.

## 1. JUSTIFICACION

Los venenos de anfibios, por sus moléculas farmacológicamente activas terminan siendo una gran fuente de material para la investigación, y para el desarrollo de productos útiles a partir de sus toxinas. La importancia de buscar nuevos antimicrobianos se debe a que varios microorganismos patógenos de animales y plantas han generado resistencia a los fármacos convencionales. En la ganadería y la agronomía, los microorganismos han desarrollado estrategias de resistencia a bactericidas y fungicidas, causando pérdidas a los productores. Debido a esto la secreción cutánea de *D. columbianus* puede tener potencial inhibitorio para *H. vastatrix*. Se han venido adelantando investigaciones para la regulación y control de estos patógenos a partir del uso de controles biológicos, como es el caso de *B. bassiana*, hongo entomopatógeno usado para contrarrestar los efectos de la Broca en el Café. La razón por la que se implementan este tipo de prácticas tiene que ver con el mantenimiento de un equilibrio ecológico que a largo plazo incrementa la sostenibilidad de la caficultura. Dado a lo anterior fue necesaria la búsqueda de sustancias de origen biológico con potencial biopesticida, en este proyecto se usó la secreción cutánea de *D. columbianus*, anfibio endémico de Colombia presente en zonas cafeteras de nuestro país.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Anfibios:

Son vertebrados tetrápodos que carecen de uñas, su piel es glandular; muy húmeda y profusamente vascularizada, la cual les sirve como un órgano respiratorio (18). Su ciclo biológico está marcado por el proceso de metamorfosis el cual inicia en el agua con el estadio larval y termina en tierra ya en estado adulto, con excepción de pocas especies que tienen desarrollo directo, presentan una amplia distribución global excepto en latitudes extremas del norte, Antártida e islas oceánicas. Existen alrededor de 7.264 especies en el mundo, de las cuales 763 se encuentran en el territorio Colombiano (3)(4) Se dividen en tres grandes ordenes, *Anura*, *Urodela* y *Gymnophiona*.

### 2.2. Generalidades de *Dendropsophus columbianus* ( Boettger, 1892):

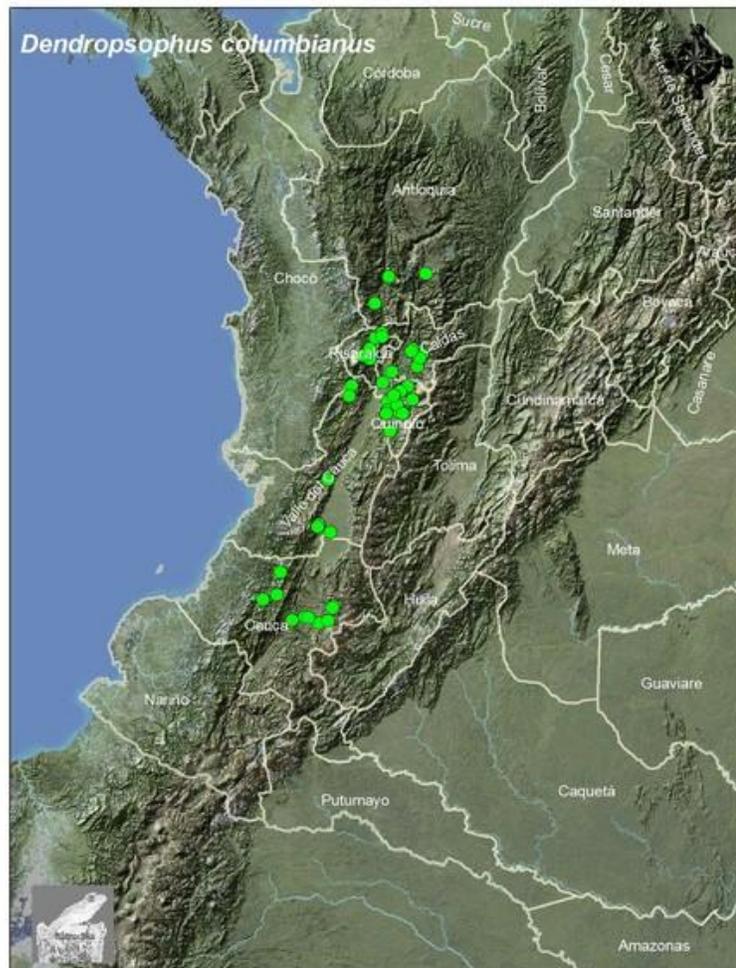
Reino: Animal →Filum: Cordata →Clase: Amphibia →Orden: Anura →Familia: Hylidae →Subfamilia: Hylinae →Género: *Dendropsophus* →epiteto específico: *Dendropsophus columbianus* ( Boettger, 1892)



**Figura 1:** Ejemplar adulto de *D. columbianus*, colectado en el sector de las Guacas- Municipio de Popayán. Foto por : Adriana Lucia Cuasapud.

La familia Hylidae en general tiene hábitos arbóreos y debido a eso la presencia de discos adhesivos en los dedos que contienen un cartílago compensando la falange terminal (el cartílago intercalares), que puede ayudar en la escalada. Dividida taxonómicamente en tres subfamilias, Hylinae a la que pertenece *D. columbianus* (49), Pelodyadinae y Phyllomedusinae.

*D. columbianus* es una especie endémica de Colombia, presente en Bosques subandinos y andinos de las dos vertientes de la cordillera central, vertiente Oriental cordillera Occidental con registros en los departamentos de Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda, Valle del Cauca y Cauca, entre los 950-2300 m.s.n.m. Se encuentra asociada a ambientes naturales, como los bordes de lagos y lagunas, así como a ambientes artificiales (jardines y estanques), es común en humedales de zonas bajas asociados a pastizales o potreros (17). Con coloraciones entre el marrón y amarillo dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentre; en el caso de las hembras presentan una coloración amarillenta con manchas oscuras en el vientre diferenciándolas de los machos por su dorso dorado y su parte ventral muy claro casi blanco (17). No se ve amenazada de manera significativa, excepto posiblemente por la contaminación del agua como consecuencia de las fumigaciones aéreas (19).



**Figura 2:** Distribución de *D. columbianus* en Colombia.  
Tomada de © 2013-2015 BATRACHIA. TODOS LOS  
DERECHOS RESERVADOS Mantenido y actualizado por  
Andrés R. Acosta- Daniel Cuentas

### **2.3. Secreción cutánea y Piel de los anfibios:**

La piel en los anfibios se encuentra compuesta por dos tipos de glándulas, granulares y mucosas, ampliamente distribuidas en el tegumento de toda la superficie del cuerpo, y que le permiten cumplir funciones de protección, respiración y osmoregulación. Las glándulas mucosas y su secreción proporcionan un revestimiento húmedo que es necesario para la respiración cutánea, la secreción tiene propiedades hidrofóbicas, que en los Hylidos producen Lípidos para evitar una deshidratación posterior durante su estadía en ambientes terrestres (18).

Las glándulas granulares, también llamadas glándulas serosas o de veneno, tienen en sus paredes células sincitiales que co-producen y co-secretan los diferentes compuestos como aminos, péptidos bioactivos y esteroides alcalinos, pueden ser distribuidas a través del cuerpo agrupadas de manera diferente en cada especie, pero a menudo se concentran alrededor de la cabeza o el cuello, por lo general son activadas por el estrés o lesión, y sus secreciones varían de una especie a otra, pasando de ser ligeramente nocivo a extraordinariamente tóxico (20)(18).

Los anfibios han desarrollado mecanismos eficaces para contrarrestar los efectos de la gran variedad de microorganismos a los que están expuestos debido a su hábitat. Uno de sus sistemas de defensa activados como alarma contra predadores o en presencia de lesión incluye la producción de secreción que se compone de aminos, alcaloides, esteroides y péptidos con efectos biológicos (citotóxico, bactericida, fungicida, lítico, neurotóxico, anestésico y cardiotoxico) (18)(20)(21)(22).

### **2.4. Hongos:**

Los hongos son organismos pluricelulares pertenecientes a los eucariotas y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Carecen de cilios, flagelos y clorofila. Tienen como estructura vegetativa la hifa la cual está rodeada por una pared celular quitinosa, esta se origina a partir de la espora y siguiendo su crecimiento ramificado termina por formar el micelio que da forma a la colonia del hongo (27).

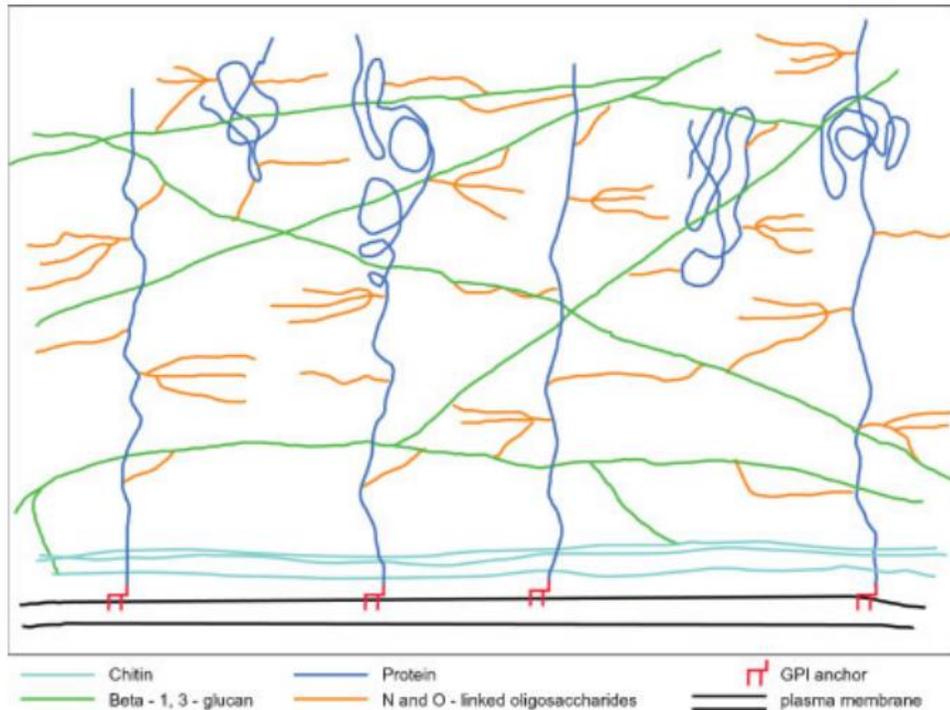
Para los hongos patógenos, la pared es el lugar de interacción con el hospedador, esta es una estructura con gran elasticidad que le otorga forma a la célula, controla su permeabilidad y la protege de los cambios osmóticos. La pared fúngica

está compuesta por polisacáridos (quitina, glucano y manano o galactomanano) y proteínas (glicoproteínas) (28). Por su composición esta estructura es el blanco importante para los antifúngicos, como las equinocandinas, primeros antimicóticos que han desarrollado un mecanismo de acción afectando a la estructura de la pared. Estos antifúngicos han mostrado un amplio espectro de actividad y una ausencia de resistencia cruzadas con otros. Es por tanto previsible que en el futuro se diseñen nuevos fármacos de la misma familia que mejoren la actividad de los actuales.

#### **2.4.1. Pared Celular de Hongos:**

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, controla la permeabilidad celular, interviene en la reproducción, interacción célula-célula y célula -matriz y protege a la célula de los cambios osmóticos, están compuestas de glicoproteínas, polisacáridos, glucano y quitina principalmente, entre otros componentes que varían entre especies. Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica.

Algunos componentes de la pared son inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección. Ya que esta estructura es una estructura vital en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse también una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos (28)



**Figura 3:** Representación de la pared celular fúngica. Los principales componentes de la pared celular fúngica son quitina, glucanos y glicoproteínas. Tomada de The structure and synthesis of the fungal cell wall, S. Bowman et al.

## 2.5. Generalidades de *Hemileia vastatrix* (Berkeley & Broome):

Dominio: *Eukaryota* → Reino: *Fungi* → Phylum: *Basidiomycota* → Subphylum: *Pucciniomycotina* → Clase: *Pucciniomycetes* → Orden: *Puccionales* → Género: *Hemileia* → Epíteto específico: *vastatrix* (Berkeley & Broome).

En Colombia tradicionalmente se han sembrado distintas variedades de café pertenecientes a la especie *Coffea arabica* con susceptibilidad al hongo causante de la roya (*H. vastatrix*), siendo el principal problema patológico en estos cultivos (12). La roya del cafeto se ha denominado como la enfermedad más destructiva y con mayor impacto económico en todo el mundo, ya que su principal efecto es la caída de las hojas, disminuyendo la capacidad fotosintética de la planta, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte en ramas e incluso la muerte de los árboles (29).

### 2.5.1. Ciclo de infección:

El proceso infectivo de la roya inicia cuando el envés de las hojas presenta manchas de color amarillo originado por las esporas, la dispersión de estas da inicio a la etapa de infección y propagación de la enfermedad sobre otras hojas y

plantas. Las esporas depositadas en el envés desarrollan los haustorios que penetran los estomas al emitir de uno a cuatro tubos germinales, para este proceso es indispensable la presencia de agua, poca o ninguna luminosidad y temperaturas entre 16°C y 28°C, la germinación dura aproximadamente de 6 a 12 horas y tiene cinco estados espóricos que se designan como: espermogonio (O), aecio (I), uredo (II), telio (III) y basidio. Después de 30 días de la colonización, se conforman los soros, los cuales producen urediniosporas, las cuales con el tiempo se transforman en telidiosporas que por meiosis forman basidiosporas haploides que al germinar forman estructuras como las hifas y conidios (12, 29,46)

### **2.5.2. Síntomas de la enfermedad:**

Los síntomas inician como pequeñas manchas de 1-3 mm, traslucidas y de color amarillo claro, la lesión crece en tamaño y pueden coalescer con otras manchas, hasta formar grandes parches con abundantes esporas en el envés de las hojas y que en el haz se observan como manchas amarillas. Las lesiones viejas se necrosan, pero la esporulación puede continuar en el margen de las lesión (29).

### **2.6. Generalidades de *Beauveria bassiana* (Collier et al. 1998):**

Reino: *Fungi* → División: *Mycota* → Subdivisión: *Eumycota* → Clase: *Deuteromycetes* → Subclase: *Hyphomycetes* → Orden: *Moniliales* → Familia: *Moniliaceae* → Género: *Beauveria* → Epiteto específico: *bassiana* (Collier et al. 1998).

La especie *B. bassiana* es un hongo cosmopolita y es el entomopatógeno comercialmente más utilizada alrededor del mundo (47). En la naturaleza este hongo se encuentra parasitando a un gran número de especies de insectos, especialmente en los órdenes Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Homoptera, Orthoptera, y otros, (31). Presenta un rango de acción muy amplio, abarcando alrededor de 750 especies de insectos, dándole un gran éxito y efectividad a la hora de combatir plagas. *In vitro* *B. bassiana* se caracteriza por su apariencia algodonosa y de color blanco, se considera como un pesticida no selectivo, ya que parasita un alto rango de especies de artrópodos. (30).

#### **2.6.1. Ciclo de infección:**

Su crecimiento y desarrollo está limitado principalmente por condiciones medioambientales adversas, especialmente la radiación solar, la baja humedad y las altas temperaturas (30). Bajo estas condiciones ocurre la germinación de la espora de *B. bassiana*, después de que las esporas (conidios o blastosporas) se

adhieren a la cutícula y germinan rompe las áreas esclerosas y membranosas de esta, con dos mecanismos de acción mecánico y químico, el primer mecanismo ejerce presión sobre los poros de la cutícula y el segundo por la presencia de enzimas como las proteasas, quitinasas y lipasas debilita la cubierta e ingresa al hemocele del insecto. Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos cambian el crecimiento micelial a fase de crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas. Aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción (47).

### 3. ANTECEDENTES

Desde 1987, cuando Michael Zasloff aisló magaininas de secreciones de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*, numerosas péptidos antimicrobianos (AMP) han sido identificados en las diferentes especies de anuros. Como resultado, la piel de la rana es ahora conocida como una de las fuentes más ricas de AMP y otras biomoléculas naturales (32)(33)

Mangoni et al. (2003) (34), aíslan en dos ciclos 17 fragmentos de péptidos, al primer grupo determinado como Ranaciclinas E aisladas a partir de la secreción cutánea de *Rana esculenta*, y el segundo como Ranaciclinas T aisladas de *Rana temporaria*. Usaron tres péptidos para evaluar el efecto antimicrobiano, dando como resultado que Ranaciclina T era el péptido más activo frente a todas las especies de hongos clínicos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida guillermondii*), Ranaciclina E en menor medida, y PLR fue el péptido menos activo sobre los tres hongos, Paralelo a esto también evaluaron la actividad antifúngica en las esporas del hongo filamentoso *Phytophthora nicotianae*, en el cual estos péptidos son activos sobre las esporas e hifas, obteniendo una inhibición en su crecimiento.

C. Bevier et al., (2004) (35), trabajaron con tres grupos, Machos Hembras y Juveniles de la especie *Rana septentrionalis*, al igual que en estudios anteriores, extrajeron la secreción por estimulación eléctrica pero también aplicaron inyecciones de norepinefrina, aislando 10 péptidos con capacidad de impedir el crecimiento de patógenos (*E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*). También observaron que los perfiles de elución de las secreciones en los tres grupos no tenían variación significativa.

El grupo de péptidos Phylloseptins estudiado por Leite et al. (2005)(36), los cuales se aislaron de la piel de *Phyllomedusa hypochondrialis* y *Phyllomedusa oreades*, presentan actividad antimicrobiana en dos bacterias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y dos Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) en comparación con los antibióticos convencionales como cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, y polimixina B.

Conceição et al. (2006) (37), estudia el efecto antimicrobiano de péptidos pertenecientes al grupo Dermaseptins que se encuentran en especies de la subfamilia Phyllomedusinae. Por HPLC se separaron péptidos de la secreción completa evaluando dos picos (PS-7 y DPh-1) en dos especies de bacterias Gram-Positivas (*S. aureus* y *M. luteus*) y dos Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*), obteniendo una inhibición del crecimiento.

A. Gomes et al.(2007) (38) reporta estudios de algunos potenciales terapeuticos que tienen las secreciones cutaneas de anuros presentes en la India, con una actividad antibiotica de amplio espectro está la familia de peptidos Magaininas aislada de la piel de *Xenopus laevis* sapo, inhibiendo el crecimiento de bacterias y especies de hongos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*. También incluye en la revisión a los péptidos de la familia Bombinas aislados de la especie *Bombina orientalis* con un efecto antibactericida mucho más fuerte que las Magaininas

N. Al-Ghaferi et al. (2010) (39) a partir de la piel de *Hylarana erythraea*, especie australiana, evaluaron la sensibilidad antimicrobiana sobre bacterias clínicas de Abu Dabi y encontraron que la concentración mínima inhibitoria (MIC) del péptido aislado B2RP contra *E. coli* fue de 12,5 M, contra *S. aureus* 12,5 M, y en contra de *Candida. albicans* 50 m. La actividad hemolítica contra eritrocitos humanos (LC 50) fue de 280 mM.

Eiko Iwakoshi-Ukena et al., (2011) (40) trabajaron con una especie de Hylido de Amami Island, *Odorrana splendida*, establecieron la Concentración Inhibitoria Mínima de los péptidos sintéticos denominados Palustrin, variando el efecto entre cada uno de los 10 péptidos aislados sobre las bacterias *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina y *Candida albicans*, siendo Palustrin 2ISa, Palustrin-2ISb y Palustrin-2ISb + 3aa los que mostraron el más amplio espectro de inhibición frente a los otros 7 péptidos.

Hui Wang et al. (2012) (41) trabajaron con una especie presente en Asia Oriental, *Odorrana hainanensis*. De su género se conocen especies con un potencial antipatogenico y amplio espectro de péptidos antimicrobiano. De la secreción completa extraída por estimulación eléctrica se purificaron 5 péptidos (Temporin-HN1, Temporin-HN2, Brevinin-1HN1, Brevinin-1V y Brevinin-2HS2) por cromatografía de fase inversa, Estos péptidos antimicrobianos muestran diversos niveles de actividad antimicrobiana para bacterias Gram-positivas y hongos, y mostraron débil o ninguna actividad frente a algunas bacterias Gram-negativas con una fuerte viabilidad tales como *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Xiaolong Yang et al. (2013) (42) identificaron peptidos de la piel de *Hylarana spinulosa*, aplicando tratamiento sobre 9 especies de bacterias y 2 de hongos, como resultado obtuvieron una amplia variedad en la actividad antimicrobiana por sus diferentes estructuras primarias, algunos con un amplio espectro inhibiendo hongos y bacterias, mientras que otros como spinulosain-A1 no muestran acción inhibitoria frente a los organismos evaluados.

Xinping Xi et al. (2013)(16) aíslan y replican un nuevo grupo de péptidos antimicrobianos llamados Medusins a partir de secreciones de *Agalychnis callidryas*, *Phyllomedusa hypochondrialis* y *Pachymedusa dacnicolor*, utilizando para esto a la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* y la levadura, *Candida albicans*. A diferencia de algunos otros grupos de péptidos presentes en la familia Hylidae los Medusins están todos desprovistos de efectos hemolíticos, evaluando este efecto con CIM. Estableciendo así la relación entre las estructuras de familias de péptidos y taxones.

En recientes estudios realizados por Conlon et al. (2014)(43) se ha extraído de la piel de *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae, Hylinae) tres tipos de péptidos (Frenatin) que muestran una potente actividad bactericida frente a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Staphylococcus epidermidis*. Con esto aumentan día a día las investigaciones a partir de las secreciones de la piel de los anfibios fuente de nuevos compuestos que incluyen AMP altamente potentes, desafiando y solucionando la resistencia de agentes patógenos a los antibióticos efectivos hasta el momento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General:

Determinar el efecto anti-fúngico de la secreción cutánea de *D. columbianus* (Hylidae) contra dos especies de hongos; *Beauveria bassiana* y *H. vastatrix* presentes en el cultivo de café (*C. arabica*).

### 4.1.1. Objetivos Específicos:

- Establecer el efecto de la secreción de *D. columbianus* contra el crecimiento de *H. vastatrix* y *B. bassiana*.
- Comparar el poder inhibitorio de la secreción de *D. columbianus* en las dos especies de hongos.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Colecta de *D. columbianus*:

La captura *D. columbianus* se realizó por búsqueda libre y sin restricciones siguiendo las vocalizaciones emitidas por los machos, entre las 19:00 y 22:00 horas cuando presentan mayor actividad dentro del humedal ubicado en el sector de Las Guacas, municipio de Popayán.

### 5.2. Extracción de la secreción cutánea por estimulación eléctrica:

Se utilizó un estimulador Eléctrico CCOR-012 de corriente directa y voltaje graduable, aplicándose 70V con potencia de un microamperio, la posición de los electrodos recubiertos con algodón húmedo varió en cada estimulación pasando por la Cloaca y la Gula principalmente. Posteriormente bajo condiciones de asepsia cada individuo se lavó dentro de un tubo Falcom de 50 ml con agua destilada estéril a presión, la solución resultante fue liofilizada y almacenada a -20°C en el ultracongelador. (figura 5).

### 5.3. Cultivo de Hongos:

#### 5.3.1. recolección de esporas de *Hemileia vastatrix*:

Las esporas fueron tomadas directamente de hojas infectadas de Café (*Coffea arabica*, variedad Típica). Inmediatamente después de la colecta se hizo el raspado de las pústulas, el resultante (10mg) se pesó en un tubo eppendorf y se mezcló con 40 ml de agua destilada estéril usando ultrasonido para garantizar la dispersión homogénea de las esporas. El montaje para los ensayos de germinación se hizo en cámara húmeda sobre placas de portaobjetos cubiertas con una lámina de parafilm, sobre las que se depositó la alícuota compuesta por 5 µL de solución de esporas (10mg esporas/40ml de agua destilada estéril) a una concentración de 70.000 esporas por ml, más 5 µL de secreción (0.75mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml). De la misma manera se hicieron 30 repeticiones por tratamiento

#### 5.3.2. Cultivo de esporas para *Beauveria bassiana*:

La cepa del hongo se obtuvo del Centro de Investigaciones Nacionales del Café (CENICAFÉ) La replicación de *B. bassiana* se hizo en el Laboratorio de Biología

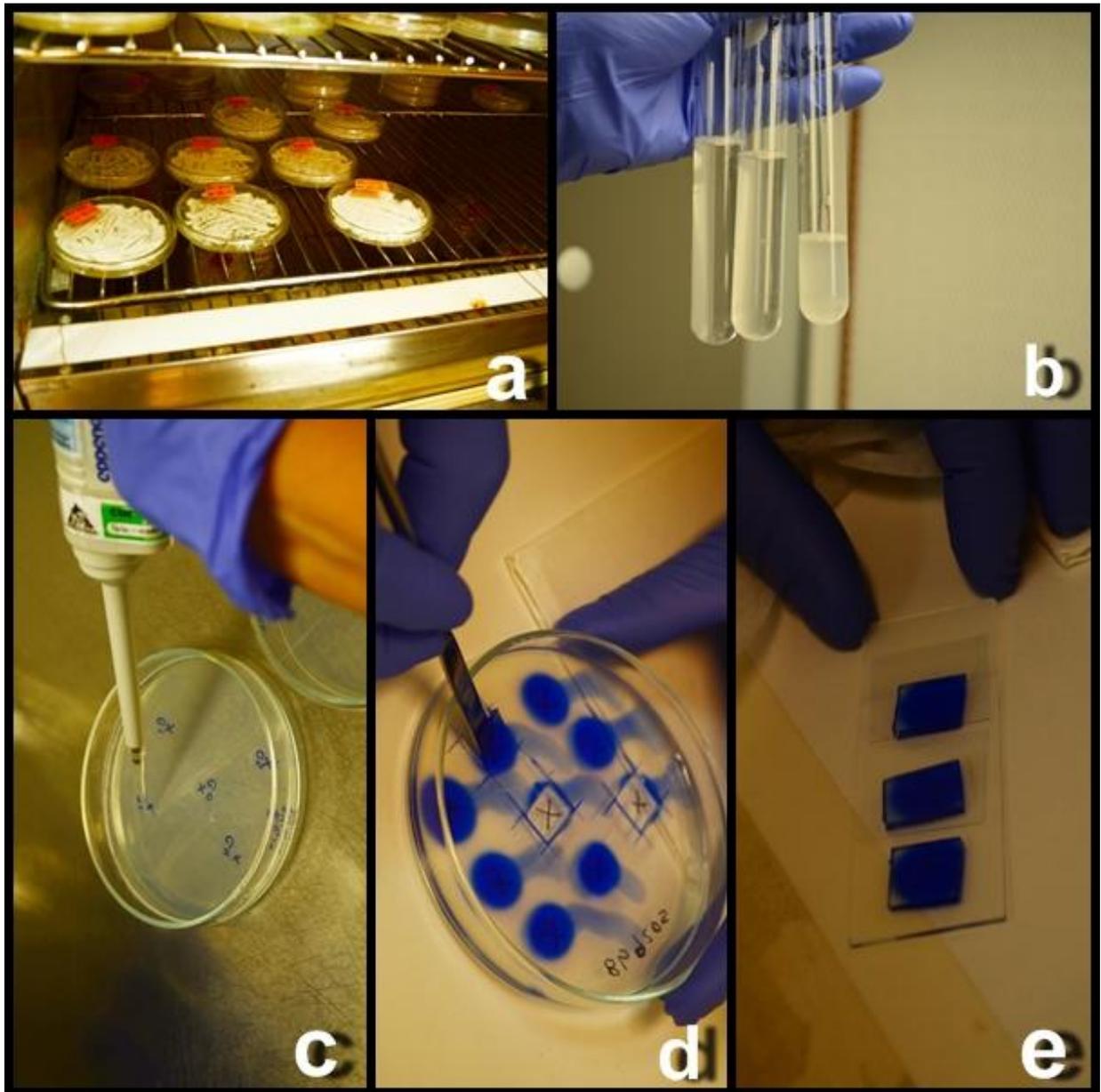
de la Universidad del Cauca, siguiendo los protocolos estándares de CENICAFE (45), la colecta de esporas se realizó a los 15 días, todo en condiciones de esterilidad. En los experimentos se utilizaron tres suspensiones de 5ml, tween al 0.1 más tres asadas de micelio, 9ml de agua destilada estéril más 1ml de la primera suspensión y 9ml de agua destilada estéril más 1ml de la segunda suspensión (Fig. 4.b.)

En una caja de Petri con PDA se aplicaron 5  $\mu$ L de la tercera solución de esporas, más 5  $\mu$ L del tratamiento (0.75mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml), y en el caso del control positivo (que indica crecimiento o exprulación) se adicionó agua destilada estéril.

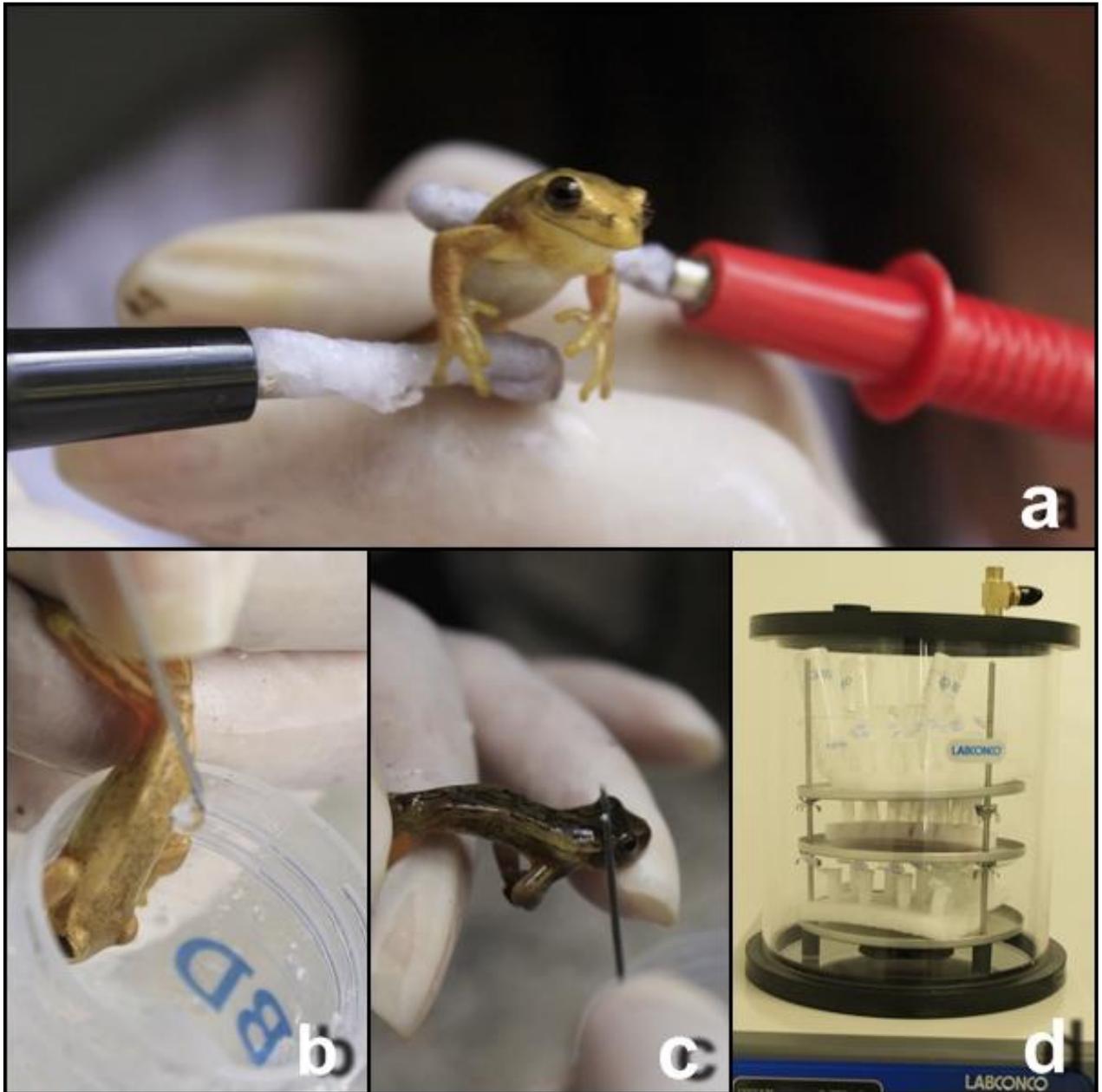
#### **5.4. Diseño experimental:**

##### **5.4.1. Tratamientos experimentales de secreción cutánea**

Se preparó una solución de secreción cutánea a una concentración de 1mg/mL, centrifugándola a 6000 r.p.m durante 15 minutos recuperándose el sobrenadante. A partir de esta se obtuvieron cuatro disoluciones: 0.75mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.25 mg/ml y 0.125 mg/ml de estas se tomaron 5  $\mu$ L que se adicionaron a 5  $\mu$ L de la suspensión de esporas de los hongos y se realizaron 30 repeticiones por tratamiento.



**Figura 4.** Proceso de cultivo y fijación de *B. bassiana* a. Sepas de *B. bassiana* en incubadora. b. Diluciones para siembra. c. aplicación de tratamientos. d. fijación y corte e. Placas con tratamientos fijados para conteo



**Figura 5:** Proceso de extracción de secreción Cutánea. a. Estimulación eléctrica b. Lavado a presión c. Raspado de secreción d. solución de agua y secreción ultracongelada en Nitrógeno Líquido y Liofilización.

#### 5.4.2. Porcentaje de germinación de esporas:

Después de 24 horas de aplicación de tratamientos se procede a fijar tanto las placas de *H.vastatrix* como los cultivos en PDA de *B. bassiana* con Azul de Lactofenol al 0.1% usada para teñir paredes celulares de Hongos. Se dejó secar por quince minutos mientras reacciona la tinción, en el caso de Roya se hace el conteo directamente en los montajes y en el de *B. bassiana* se corta la sección alrededor del inóculo y se monta sobre un porta objetos (fig 4..e). El conteo para calcular el porcentaje de germinación se hizo bajo un microscopio Óptico de alta resolución y se estableció a partir de la siguiente fórmula:

$$\%g = \left( \frac{\# \text{ esporas germinadas}}{\# \text{ esporas germinados} + \# \text{ esporas no germinadas}} \right) * 100$$

#### 5.4.3. Variación

Esta prueba se dividió en dos etapas, para *B. bassiana* la primera inició desde la inoculación de las esporas en el medio y en el caso de *H.vastatrix* cuando se depositó la alícuota de esporas en agua sobre la placa, pasadas 12 horas de incubación a 27°C y 25°C respectivamente después de la siembra se aplicaron los tratamientos y se incubaron nuevamente durante 12 horas. Después de 24 horas de germinación las muestras se tiñen con Azul de Lactofenol y se realiza la comparación entre los controles y los tratamientos.

#### 5.4. Análisis estadístico:

El poder inhibitorio de la secreción cutánea de *D. columbinaus* contra los hongos, se evaluó usando un diseño completamente al azar (DCA), los datos obtenidos en las 30 repeticiones por dosis se analizaron según su ajuste a la curva normal y homogeneidad de varianzas, como los datos no cumplieron uno de estos criterios se usó su equivalente no paramétrico test de Kruscal-Wallis con post test de student-newman keulsDunnet,. Para esto se usó el software Bioestat 5,3 y los datos con significancia estadística se graficaron con el software GraphPad Prism 5,0.

## 6. RESULTADOS

Los experimentos realizados buscaban optimizar el proceso, por lo que las pruebas de germinación específicamente para *H.vastatrix* (Roya) se hicieron en soluciones que diferían en su pH, ya que se observó que a menor pH el porcentaje de germinación aumentaba. Las soluciones usadas fueron agua de lluvia, agua de río, agua destilada y agua destilada acidulada. Finalmente se escogió el agua destilada (pH= 6,2), solución adecuada para el desarrollo de los tubos germinales.

### 6.1. Porcentaje de germinación de esporas

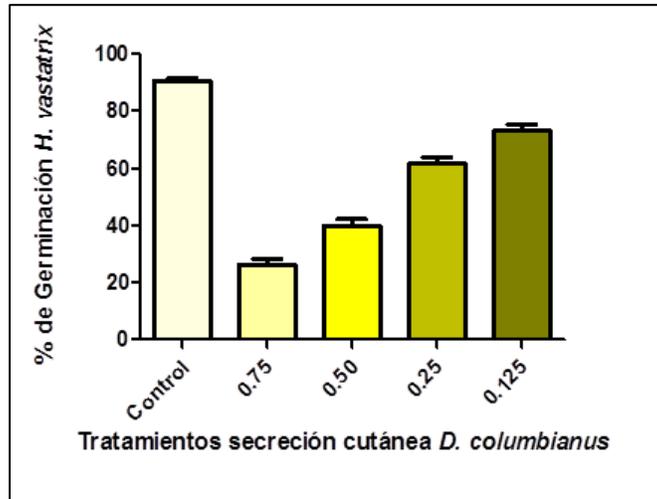
#### 6.1.1. Prueba de Germinación de esporas de *Hemileia vastatrix*.

Los datos obtenidos en el conteo de esporas no se ajustaron a la distribución normal y no presentaron homogeneidad de varianzas, por esta razón se aplicó un ANOVA de Kruskal–Wallis el cual muestra que hubo diferencia significativa entre los tratamientos ( $H=41.2434$ ;  $p= 0.0000$ ).

Al hacer las comparaciones múltiples se encontró diferencia significativas en todos los tratamientos con excepción del control y el primer tratamiento, el segundo con el tercero y el tercero con el cuarto (Tabla 1, figura 6).

**Tabla 1. Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de student-newman keuls para evaluar la diferencia entre tratamientos.**

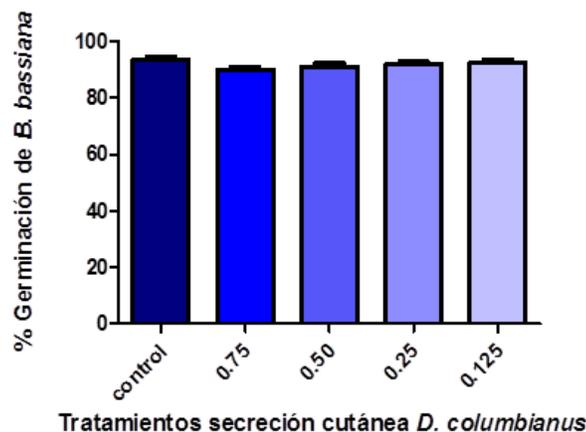
mg/ml	Control	0,125	0,25	0,5	0,75
Control	-	-	-	-	-
0,125	0.9267	-	-	-	-
0,25	0.0130	0.0100	-	-	-
0,5	0.0002	0.0001	0.1923	-	-
0,75	< 0.0001	< 0.0001	0.0114	0.2198	-



**Figura 6.** Porcentaje de germinación de *H. vastatrix*

## 6.2. Prueba de Germinación de *Beauveria bassiana*

Los datos obtenidos en los conteos de esporas germinadas frente a los tratamientos aplicados de secreción cutánea de *D. columbianus* no se ajustaron a la normal y no presentaron homogeneidad de varianzas, por lo que también se aplicó un ANOVA de Kruskal–Wallis ( $H= 9,4303$ ;  $P= 0,0512$ ). La prueba muestra que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ( figura 6)



**Figura 7:** Porcentaje de germinación de *B. bassiana*

### 6.3. Tubos Germinales de *H. vastatrix*.

El efecto de la secreción sobre los tubos germinales, urediosporas y apresorios es evidente en el primer tratamiento comparado con el control el cual muestra estas tres estructuras bien definidas y en su estado natural sin ningún tipo de afectación. el daño es directamente proporcional a la concentración de los tratamientos ( figura 8 y 9)

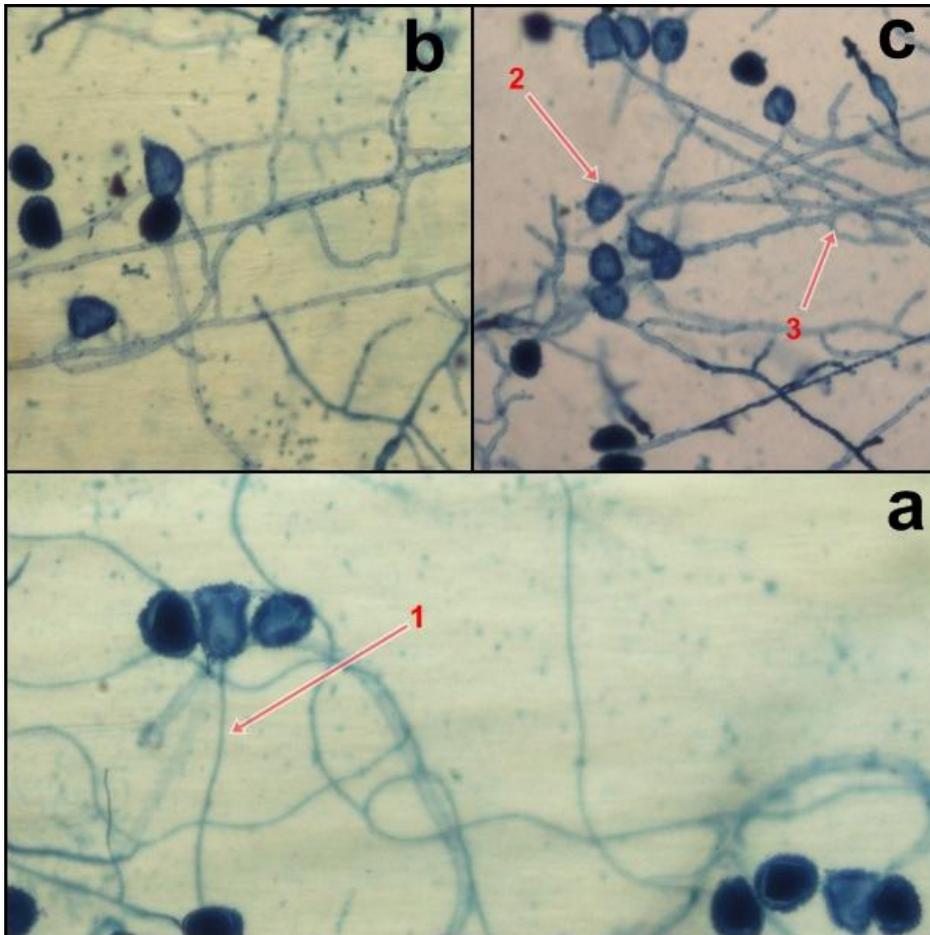
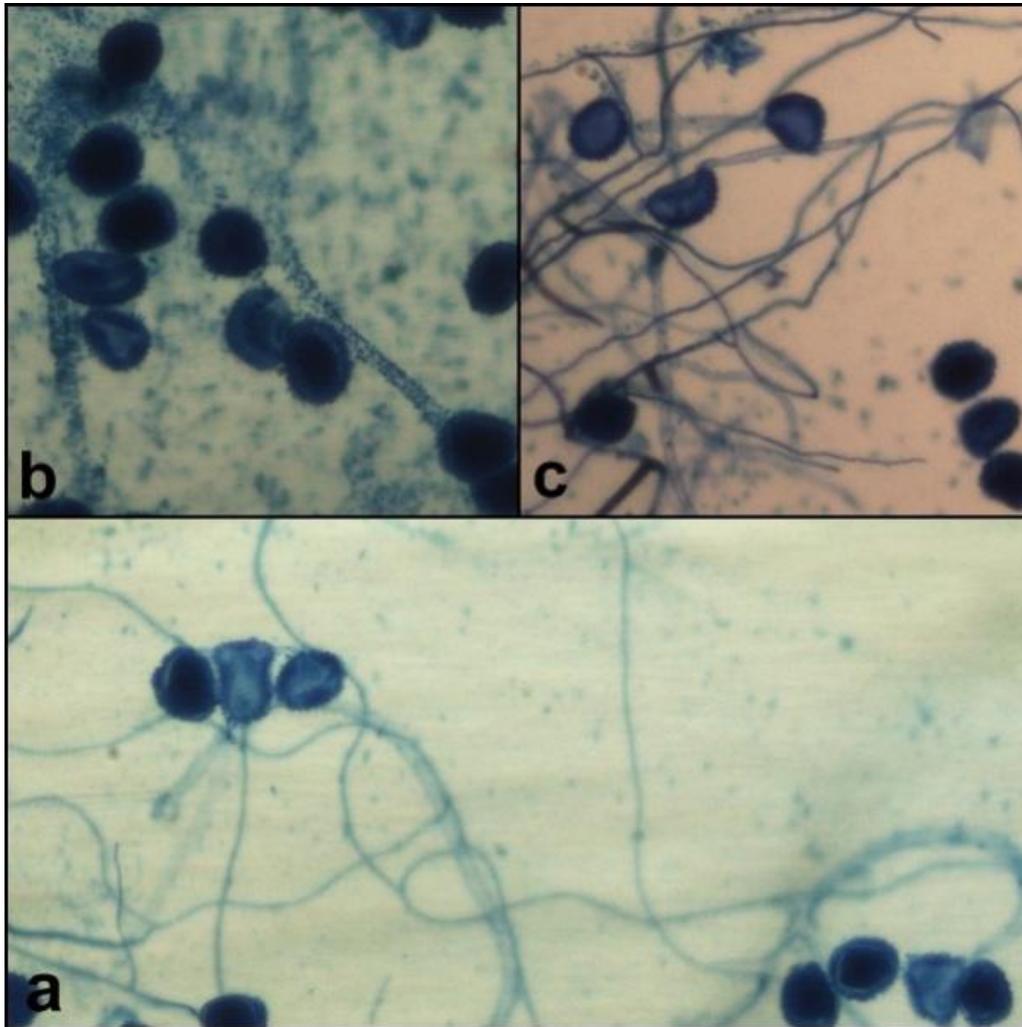


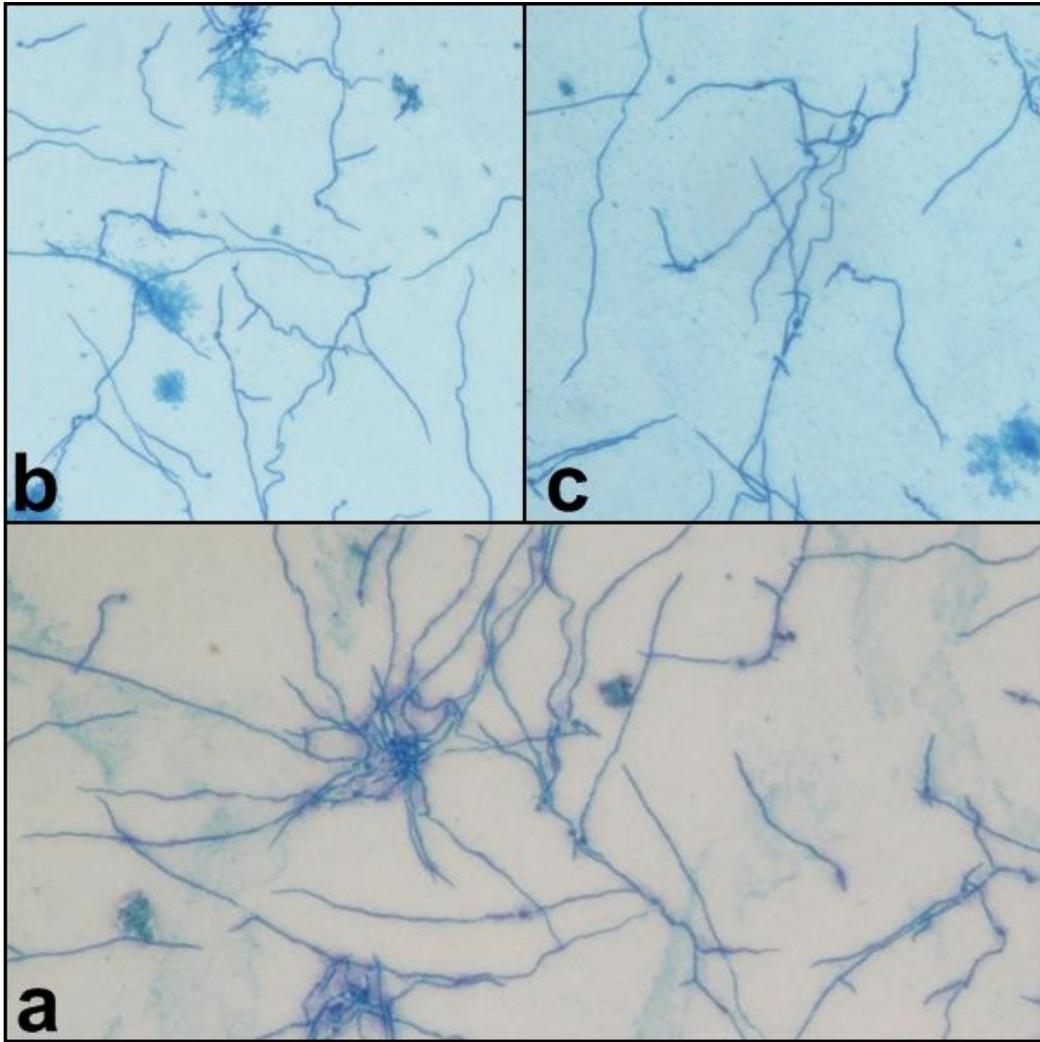
Figura 8: Estructuras germinales de *H. vastatrix* a. control de esporas en agua, b. tratamiento 1 de 0.75 mg/ml, c. tratamiento 2 de 0.50 mg/ml. Fotografías por Adriana Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR), marca Nikon-modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X.



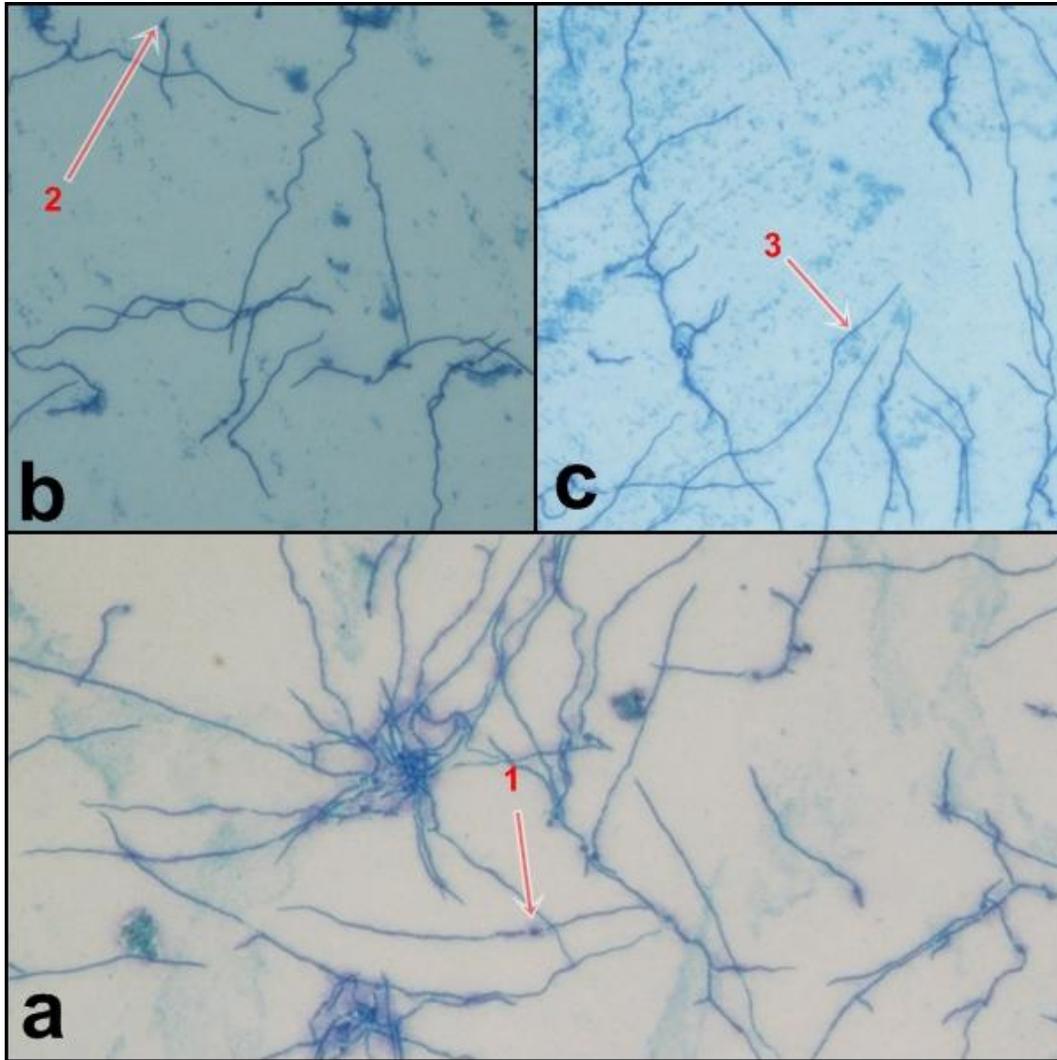
**Figura 9:** Estructuras germinales de *H. vastatrix* a. control de esporas en agua, b. tratamiento 3 de 0.25 mg/ml, c. tratamiento 4 de 0.125 mg/ml. Fotografías por Adriana Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X.

#### 6.4. Tubos Germinales de *Beauveria bassiana*.

Las estructuras germinales que se expusieron a los tratamientos de la secreción de *D. columbianus* no tuvieron ningún tipo de daño, dentro de las 24 horas en las que se incubaron las muestras no hubo ningún efecto por parte de la secreción al hongo ( Figura 10 y 11)



**Figura 10:** Estructuras germinales de *B. bassiana* a. control de esporas en agua, b. tratamiento 1 de 0.75 mg/ml, c. tratamiento 2 de 0.50 mg/ml. Fotografías por Adriana Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X.



**Figura 11:** Estructuras germinales de *B. bassiana* a. control de esporas en agua, b. tratamiento 3 de 0.25 mg/ml, c. tratamiento 4 de 0.125 mg/ml. Fotografías por Adriana Cuasapud. En microscopio Óptico de Luz de alta resolución (MOAR) , marca Nikon-modelo Eclipse 80i, sistema de captura de imagen Nis Elements) objetivo:40X.

## 7. DISCUSIÓN

Las pieles de los anfibios poseen glándulas que proporcionan humedad y secretan péptidos antimicrobianos para reducir el riesgo de infección al que están expuestos por la cantidad de patógenos presentes en sus hábitats (23). La secreción de Hylidos se compone principalmente por péptidos con actividad antimicrobiana, lo que permite sugerir que *D. columbianus* genera un efecto antifúngico en la etapa inicial del ciclo infeccioso del hongo fitopatógeno *H. vastatrix* por la biosíntesis de moléculas protéicas con esa capacidad.

En general los hongos fitopatógenos son controlados por fungicidas sintéticos y biocontroladores de baja efectividad. En este estudio, la secreción del anuro reaccionó inhibiendo la germinación de esporas de *H. vastatrix* desde los 0.125 mg/ml y al compararlo con controladores biológicos este presenta una mayor efectividad, por ejemplo en el caso de la secreción de *Theloderma kwangsiensis* que tiene presencia de péptidos que si bien no se han identificado reaccionan generando una capacidad antimicrobiana fuerte contra *B. dysenteriae* y *S. aureus* con una CIM de 3 mg / ml (23). Haddad *et al.* en 2009 con la evaluación de tratamientos a partir de bacterias antagónicas aplicados en campo directamente sobre el hongo, observó que ninguno de los tratamientos redujo tanto la incidencia y la gravedad del hongo, ya que la incidencia supero el 37% que es inaceptable para un control exitoso de roya (50)

Los estudios sobre controladores biológicos de plagas que afectan los cultivos de café se han centrado en Roya y para esta afección se reportan tres tipos: Hiperparasitismo, antimicrobianos o antibiosis (*Verticillium sp*) y resistencia inducida, todos los anteriores con poca efectividad frente a los efectos de antifúngico a base de cobre, un trabajo importante de integrar a este trabajo es el de Shiomi en 2006 en el que se evaluó el efecto de aislados de bacterias endofíticas sobre las urediniosporas y se obtuvo un 40% de inhibición siendo más efectiva la secreción completa de *D. columbianus* con un 77% reportado para 0.75 mg/ml (24).

En el caso de *B. bassiana* los resultados muestran la prevalencia del proceso germinal frente a la acción de la secreción cutánea. A pesar de que no hay estudios que evidencien la resistencia de este hongo a secreciones naturales de anuros es necesario afirmar que podría deberse a que estos entomopatógenos inicialmente poseen una pared celular mejor estructurada que la de los fitopatógenos conteniendo polisacáridos (80%), proteínas (3-20%), lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en cantidades menores, moléculas que necesitan de sustancias mucho más efectivas para su degradación (25),

además de esto es importante afirmar que estos patógenos al desarrollar las estructuras de infección producen toxinas (proteasas) correlacionadas en la formación del apresorio, pues necesitan degradar fibrillas de quitina, ceras que contiene ácidos grasos, lípidos y esteroides que componen la cutícula del insecto y en el proceso y que ya se han clasificado como propias de este género de hongos (Beauvericinas) (26)(51)(52). Estas proteasas pueden inhibir la acción antimicótica de la secreción de *D. columbianus* para este hongo, por lo contrario *H. vastatrix* no presenta estas proteasas y aquí la secreción cutánea si inhibe su crecimiento.

Este trabajo demuestra la efectividad de la secreción cutánea de *D. columbinaus* sobre las la Roya que afecta al café, sin incidir negativamente sobre otros biocontroladores en este caso *Beauveria bassian*.

## 8. CONCLUSIONES

- La secreción cutánea total del anuro *Dendropsophus columbianus* inhibe la germinación de esporas del hongo fitopatógeno *H. vastatrix*, en las concentraciones 0.75mg/ml el 74.1% , 0.50 mg/ml el 60.2% y 0.25 el 38.5% mg/ml.
- El proceso germinal de las esporas del hongo entomopatógeno controlador biológico no se ve inhibido por la secreción completa de *D. columbianus*, lo que es de gran importancia porque el crecimiento de otras plagas similares ya controladas o inhibidas no se altera.
- Los tubos germinales de *H. vastatrix* y *B. bassiana* no son afectados por la secreción cutánea total de *D. columbianus*.

## 9. RECOMENDACIONES

- Es necesario que en un estudio posterior se identifiquen las moléculas responsables del efecto antimicótico que se observó por parte de la secreción de *D. columbianus*, además de conocer otros usos y beneficios dentro del campo de los biocompuestos.
- Identificar el mecanismo de acción de las moléculas responsables de la actividad antimicótica.
- En cuanto a los estudios que se realicen posteriormente con *Roya*, es importante tener en cuenta las condiciones estrictas de temperatura, humedad y luminosidad para una óptima germinación.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Castro-Herrera, W. F&, Bolivar-Garcia. Libro rojo de los anfibios del valle del cauca. Cali- Colombia; 2010. p. 200.
2. Angulo A, Rueda-Almonacid J, Rodriguez-Mahecha J, La Marca E. Técnicas de Inventarios Y Monitoreo Para Los Anfibios de la Región Tropical Andina. 2006. p. 298.
3. History A museum of natural. American museum of natural history [Internet]. Available from: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/index.php>
4. Colombia S de información sobre B de. No Title [Internet]. Available from: <http://www.sibcolombia.net/web/sib/cifras>
5. Dornelles MF, Boucinha G, Ferret M. Revisão sobre toxinas de Anura ( Tetrapoda , Lissamphibia ) e suas aplicações biotecnológicas and biotechnological applications. 2011;103–17.
6. Rollins-Smith L a. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.; 2009 Aug;1788:1593–9.
7. Ali MF, Knoop FC, Vaudry H, Conlon JM. Characterization of novel antimicrobial peptides from the skins of frogs of the *Rana esculenta* complex. Peptides. 2003 Jul;24:955–61.
8. Cho JH, Sung BH, Kim SC. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.; 2009 Aug;1788:1564–9.
9. Montes C, Armando O, Cadena R. Infestación e incidencia de Broca, Roya y Mancha de Hierro en cultivo de Café del departamento del Cauca. Biotecnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial. 2012;10(1):98–108.
10. Moreno G, Alvarado GA. La Variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. CENICAFÉ. 2000;32.
11. Garcia J, Alvarado J, Garcia E. Efectos de la roya del cafeto sobre la rentabilidad del cultivo de café, y sus implicaciones económicas y sociales

- en el Salvador. Bol. ciencias económicas y Soc. la Univ. Centroam. José Simeón Cañas. 1979;146–8.
12. Carlos A. Rivillas Osorio, Cesar A. Serna Giraldo, Marco A. Cristancho Ardila ALGB. La Roya del Cafeto en Colombia: Impacto, Manejo y Costos del control. 2011;52.
  13. Posada F, Villalba D, Bustillo A. Los insecticidas y el hongo *Beauveria bassiana* en el control de la Broca del Café. Cenicafé. 2004;55:136–49.
  14. Posada F, Villalba Gault D, Pardey AB. Los insecticidas y el hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del Café. CENICAFÉ. 2004;55:136–49.
  15. Xiao X-H, Miao H-M, Xu Y-G, Zhang J-Y, Chai L-H, Xu J-J. Analysis of skin and secretions of Dybowski's frogs (*Rana dybowskii*) exposed to *Staphylococcus aureus* or Escherichia coli identifies immune response proteins. Vet. J. Elsevier Ltd; 2014 Apr;200:127–32.
  16. Xi X, Li R, Jiang Y, Lin Y, Wu Y, Zhou M, et al. Medusins: a new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of *phyllomedusine* frogs. Biochimie. Elsevier Masson SAS; 2013 Jun;95(6):1288–96.
  17. Mendoza A, Aguirre L, Sarria M, Giraldo A. Hongos dérmico saprófitos de *Dendropsophus columbianus* (Hylidae) en Caloto, Colombia. Bol. Cient. Cent. Museos Mus. Hist. Nat. 2012;16(1):33–40.
  18. G.M.Jamieson B. Volumen 2 of series: Reproductive Biology an Phylogeny. Reprod. Biol. Phylogeny Anura. 2003. p. 463.
  19. Bolívar W, Rengifo JM. 22 de Enero de 2015, [http://amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?wheregenus=Dendropsophus&where-species=columbianus](http://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?wheregenus=Dendropsophus&where-species=columbianus).
  20. Gomes A, Giri B, Saha A, Mishra R, Dasgupta SC, Debnath A, et al. Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. Indian J. Exp. Biol. 2007 Jul;45:579–93.
  21. Gebhard LG, Carrizo FU, Stern AL, Burgardt NI, Faivovich J, Lavilla E, et al. A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. Eur. J. Biochem. 2004 Jun;271:2117–26.

22. Myers C, Daly J. Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolutionary studies of poison-dart frogs (Dendrobatidae). *Am. Museum Nat. Hist.* 1976;157:100.
23. Shen, W., Chen, Y., Yao, H., Du, C., Luan, N., & Yan, X. (2016). A novel defensin-like antimicrobial peptide from the skin secretions of the tree frog, *Theloderma kwangsiensis*. *Gene*, 576, 136–40.
24. Shiomi, H. F., Sandro, H., Silva, A., Melo, I. S. De, Vieira, F., & Bettioli, W. (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust., 32–39.
25. Pucheta Díaz Micaela, Flores Macías Antonio, Rodríguez Navarro Silvia, de la Torre Mayra. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI [Internet]. 2006 Dic [citado 2016 Feb 15]; 31( 12 ): 856-860.
26. Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). *Entomopathogenic Fungi* (pp. 475–505).
27. Quiroga M, Peniche R. Características Generales de Organismos Pluricelulares. *Biol. II.* 2012. p. 88.
28. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev. Iberoam. Micol.* 2008 Jun;25(2):78–82.
29. Dirección General de Sanidad Vegetal, Central Nacional de Referencia Fitosanitaria SN de VEF. Ficha Técnica de Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix*). 2013 p. 1–28.
30. Gongora C, Marin Marín P, Machado PB. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del Café. *Av. Tec. CENICAFÉ.* 2009;384:8.
31. 22 de Junio 2015, <http://www.bioworksinc.com/products/shared/botanigard-es-introduccion.pdf> ,BotaniGard Tech Bulletin. 2006 p. 1–5.
32. Mangoni ML. Preface to amphibian antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* Elsevier B.V.; 2009 Aug;1788:1535–6.
33. Zasloff M. Magainins , a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin : Isolation , characterization of two active forms , and partial cDNA sequence of a precursor. 1987;84(August):5449–53.

34. Mangoni ML, Papo N, Mignogna G, Andreu D, Shai Y, Barra D, et al. Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity. *Biochemistry*. 2003 Dec;42:14023–35.
35. Bevier CR, Sonnevend A, Kolodziejek J, Nowotny N, Nielsen PF, Conlon JM. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the mink frog (*Rana septentrionalis*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2004 Oct;139:31–8.
36. Leite JRS a, Silva LP, Rodrigues MIS, Prates M V, Brand GD, Lacava BM, et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. 2005 Apr;26:565–73.
37. Conceição K, Konno K, Richardson M, Antoniazzi MM, Jared C, Daffre S, et al. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*. 2006 Dec;27:3092–9.
38. Gomes A, Giri B, Saha A, Mishra R. Bioactive molecules from amphibian skin : Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. 2007;45(July):579–93.
39. Al-Ghaferi N, Kolodziejek J, Nowotny N, Coquet L, Jouenne T, Leprince J, et al. Antimicrobial peptides from the skin secretions of the South-East Asian frog *Hylarana erythraea* (Ranidae). *Peptides*. Elsevier Inc.; 2010 Apr;31:548–54.
40. Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Okimoto A, Soga M, Okada G, Sano N, et al. Identification and characterization of antimicrobial peptides from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides*. Elsevier Inc.; 2011 Apr;32:670–6.
41. Wang H, Yu Z, Hu Y, Li F, Liu L, Zheng H, et al. Novel antimicrobial peptides isolated from the skin secretions of Hainan odorous frog, *Odorrana hainanensis*. *Peptides*. Elsevier Inc.; 2012 Jun;35(2):285–90.
42. Yang X, Hu Y, Xu S, Hu Y, Meng H, Guo C, et al. Identification of multiple antimicrobial peptides from the skin of fine-spined frog, *Hylarana spinulosa* (Ranidae). *Biochimie*. Elsevier Masson SAS; 2013 Dec;95:2429–36.
43. Conlon JM, Mechkarska M, Radosavljevic G, Attoub S, King JD, Lukic ML, et al. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the

frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). Peptides. Elsevier Inc.; 2014 Jun;56:132–40.

44. Martínez CP, Echeverri C, Florez JC, Gaitan AL, Góngora CE. In vitro production of two chitinolytic proteins with an inhibiting effect on the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae) and the fungus *Hemileia vastatrix* the most limiting pests of coffee crops. *AMB Express*. Springer Open Ltd; 2012 Jan;2:22.
45. Patricia Velez, Maria Estrada, Maria Gonzales, Ana Valderrama AB. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo integrado de plagas*. 2001;(62):38–53.
46. Zuluaga CM, Sc M, Céspedes PB. Generalidades de los uredinales( Fungi : Basidiomycota ) y de sus relaciones filogenéticas. 2008;14:41–56.
47. Romarico arroyo, Francisco Gurria, Luis Aguirre, Luis Villareal, Hugo Arredondo VH. *Uso de Beauveria bassiana como insecticida Microbial*. 1999.
48. Tyler MJ, Stone DJM, Bowie JH. A novel Method for the Realease and Collection of Dermal, Glandular Secretions From the skin of Frogs. 1992;28:0–1.
49. Wheeler WC. Systematic Review of the frog Family Hylidae, with special reference to Hyliinae: Phylogenetic analysis and Taxonomic Revision. 2005;(294).
50. Haddad, F., Maffia, L. a., Mizubuti, E. S. G., & Teixeira, H. (2009). Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control*, 49(2), 114–119.
51. Pucheta Díaz Micaela, Flores Macías Antonio, Rodríguez Navarro Silvia, de la Torre Mayra. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI [Internet]. 2006 Dic [citado 2016 Mar 14] ; 31( 12 ): 856-860. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es).
52. Neville, A.C., 1984. Cuticle: organization. In: Bereitor, J., et al. (Ed.), *Biology of the Inttegument*. Springer, Berlin, Germany, pp. 611–625.