

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERIA EN AGROECOLOGIA TROPICAL**



**EVALUACION DE LA EFICACIA DEL SISTEMA DE PRODUCCION LIQUIDA
PARA LA OBTENCION DE BLASTOSPORAS DE *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill.
CAMPUS AGROPECUARIO 2005.**

Previo para optar al titulo de ingeniero en Agroecología Tropical

**PRESENTADO POR: Br. Claudia Vanessa Rivera Z.
Br. Claudia Vanesa Rojas T.
Br. Denis Soza.**

TUTOR: Lic. Marcia Gómez.

León, Noviembre 2005.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii, iii, iv
RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. HIPOTESIS.....	3
IV. MARCO TEORICO.....	4
4.1 Hongos entomopat6genos.....	4
4.1.1 Hongo <i>Beauveria bassiana</i>.....	4
4.1.2 Morfologfa.....	5
4.1.3 Taxonomia.....	5
4.1.4 Patogenicidad y virulencia.....	6
4.1.5 Modo de acci3n de <i>B. bassiana</i>.....	6
4.1.6 Sntomas.....	9
4.2 Reproducci3n del hongo <i>B.bassiana</i>.....	9
4.2.1 Clasificaci3n de medios de cultivos.....	10
4.2.2 Medios de cultivos mas utilizados.....	10
4.2.3 Proceso de producci3n masiva de hongos.....	11
4.2.4 Caracterfsticas o propiedades de un pat6geno para ser efectivo como bioinsecticida.....	13
4.2.5 Ventajas de hongos entomopat6genos.....	14
4.2.6 Impacto ambiental de los hongos entomopat6genos.....	14

4.2.7	Uso actual y futuro de hongos entomopatógenos.....	15
4.3	Estudio realizados en México con blastosporas.....	16
V.	MATERIALES Y METODOS.....	17
5.1	Inoculación y producción de la cepa.....	17
5.1.1	Elaboración del medio líquido.....	17
5.1.2	Siembra del hongo.....	18
5.1.3	Conteo de blastosporas.....	18
VI.	RESULTADOS.....	20
VII.	CONCLUSIONES.....	23
VIII.	RECOMENDACIONES.....	24
IV.	BIBLIOGRAFIA.....	25
X.	ANEXOS.....	27

INDICE DE GRAFICA Y TABLAS

	Página
Gráfica No. 1 Variación de las medias de la concentración de blastosporas en el Tiempo.....	20
Tabla No. 1 Análisis de varianza.....	21
Tabla No. 2 Costos de producción de blastosporas en medio líquido.....	22

AGRADECIMIENTO

A nuestra tutora Lic. Marcia Gómez por su tiempo, paciencia y disponibilidad para ayudarnos durante la realización de nuestro trabajo.

Al Msc. Juan Jovel por habernos brindado información valiosa para nuestro trabajo de tesis.

Al Msc. Wilver José Salazar Antón por su apreciable tiempo y ayuda para la realización de nuestro trabajo.

Al profesor Adalberto Menbreño por su ayuda y disponibilidad para la elaboración de nuestro trabajo.

Al laboratorio de control Biológico de la UNAN-León por sus servicios y prestaciones para realizar el presente trabajo.

Claudia Vanessa Rivera Zeledón.
Claudia Vanessa Rojas Toruño.
Denis Soza Vega.

DEDICATORIA

A Dios Nuestro Señor por haberme concedido la vida y el aliento en todo momento para culminar mis estudios universitarios.

A mi madre Rosaura Zeledón por amarme y cuidarme en las buenas y en las malas apoyándome en todo lo que he necesitado.

A mi padre José Arturo Rivera S. Por ser mí ejemplo de superación en la vida y ser el soporte en todo momento para terminar mis estudios universitarios.

A mis hermanos Arturo José Rivera Z. y Noel Alberto Rivera Z. Porque de una u otra manera me ayudaron y me dieron ánimos a seguir adelante.

A todas aquellas personas que me motivaron, para que no me rindiese ante los problemas.

Claudia Vanessa Rivera Zeledón.

DEDICATORIA

A Dios Nuestro Señor por haberme regalado la vida y permitir concluir mis estudios.

A la memoria de mi padre Bartolomé Rojas Ruiz y a mi abuelita Amanda Rodríguez Blandon por sus sacrificios y oraciones.

A mi mama Daysis Toruño Rodríguez por su comprensión

A mi hija Daysi Vanessa por que fue el motivo de mi lucha.

A mis hermanos: Dinora, Anabell, Klely, Erick, Néstor por apoyarme.

A mi esposo Mario Prado por darme su apoyo y a todas las personas que me ayudaron. .

Claudia Vanessa Rojas Toruño.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza y sabiduría para concluir mis estudios y permitirme cumplir parte de mis metas.

A mis padres por inculcarme buenos valores y darme apoyo económico y moral.

A mis hermanos por ser fuerza inspiradora de superación.

A mis familiares y amigos que siempre me brindaron su confianza y apoyo.

Denis Rolando Soza Vega.

RESUMEN

La producción de hongos entomopatógenos, como es el caso de *Beauveria bassiana* el cual se ha utilizado por varios años en cultivos sólidos y semisólidos con resultados de patogenicidad satisfactorios, pero con bajos rendimientos de producción. Uno de los problemas más sentidos e importantes en Nicaragua son las pérdidas económicas causadas por insectos plagas y enfermedades. La opción de manejo ha sido históricamente el uso indiscriminado de pesticida químico. Debido a esto la producción de hongos entomopatógenos ha tomado auge en el país. Los hongos entomopatógenos han probado ser efectivos controladores de insectos. El propósito del estudio es evaluar el sistema de producción de blastosporas así como evaluar la calidad de la producción de blastosporas y determinar sus costos de producción. En el presente trabajo se llevó a cabo la propagación del hongo *Beauveria bassiana* de la cepa 114 en un medio líquido a base de Papa y Dextrosa (PD), se colocó el inóculo del hongo en un erlenmeyer y se agitó por 5 días a 150 rpm. Una vez realizado los 4 ensayos se obtuvo la aparición de blastosporas a las 3 horas de agitación. El conteo de blastosporas se realizó tomando muestra del hongo y colocándolo en el hemocitometro (cámara de Neubauer), utilizando la fórmula propuesta por Alves (1986). El conteo se elaboró con un formato de: 0 h, 3 h, 9 h, 21 h, 45 h, 57 h, 69 h, y 120 h. Como resultado del estudio se observó que las concentraciones de blastosporas en las primeras 45 horas no son significativas cuando se les compara con las producidas en los últimos conteos (57 h, 69 h, 120 h), podemos decir que la pureza del proceso de producción es buena ya que no se tuvo contaminación. Estos resultados indican que el mejor momento de la inoculación con este tipo de material es a partir de las 57 horas ya que es aquí donde se encuentran el mayor número de blastosporas presente. Los costos de producción fueron de 18.34 dólares para producir 800 bolsas en los 4 ensayos realizados. A partir de las 57 horas de agitación el medio (PD) aumentó su número de blastosporas oscilando entre 10^7 y 10^9 presentándose un nivel de contaminación del 0 %. Se recomienda realizar estudios de patogenicidad, virulencia, y viabilidad.

I. INTRODUCCION

En Nicaragua el manejo de las plagas ha sido orientado al uso de productos químicos, pero estos insecticidas no han dado la respuesta deseada, ya que cada año aumenta el número de dosis y aplicaciones, lo que ha generado cierta resistencia en las poblaciones de insectos. (Gómez, 1996).

Debido a problemas de plagas y uso excesivo de químicos en Nicaragua se ha visto la necesidad del uso de control biológico como la producción de hongos entomopatógenos en forma artesanal, y semi industrial para disminuir el uso de insecticidas. (Gómez, 1996).

El hongo *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill, pertenece a la clase Deuteromycetes presenta unas estructuras que son visibles al microscopio llamadas fiálidas o células conidiógenas que tienen una base globosa o sea en forma de botella y se extienden apicalmente en grupos densos. Estas fiálidas presentan un raquiz que es denticulado en zig- zag y se extiende apicalmente con un conidio por denticulo.

El estudio de la eficacia del sistema de producción líquida para la obtención de blastosporas es de gran importancia ya que en Nicaragua no se ha realizado ningún estudio y este sería uno de los primeros que nos permitirá determinar en cuanto tiempo se desarrollan las blastosporas y como el uso de estas en vez de conidias vendría a mejorar el proceso de producción ya que nos aumentaría considerablemente la cantidad de bolsas a inocular ya que utilizando el método sólido de una matriz se inoculan 30 bolsas y utilizando el medio líquido inocularíamos 80 bolsas esto nos permitiría ahorrar tiempo ya que para que las conidias crezcan se toma mas tiempo que el que se necesita para el desarrollo de las blastosporas.(Gallegos,G, 2003).

II. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia del sistema de producción líquida para la producción de blastosporas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la curva de crecimiento de blastosporas de *Beauveria bassiana* cepa 114 a diferentes tiempos.
- Evaluar la calidad de la producción de blastosporas en medio líquido.
- Determinar los costos de producción del sistema de producción de *Beauveria bassiana*.

III. HIPOTESIS.

La cepa 114 de *Beauveria bassiana* puede producir una concentración de Blastosporas 10^{12} en medio líquido.

IV MARCO TEORICO

4.1 Hongos Entomopatógenos.

Son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados. Estos hongos se encuentran en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, plantas, etc, los cuales logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico, de insectos plagas. (Roberts, 1989).

Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Akanthomyces*, *Hirsutella*, *Hymenostible*, *Phaevelomyces* y *Verticillium*. Los organismos antes mencionados son considerados hongos entomopatógenos porque son capaces de causar enfermedad y muerte a insectos plagas (Roberts, 1989).

4.1.1 Hongo *Beauveria bassiana*.

El género más estudiado para el control de plaga es: *Beauveria bassiana*, el cual fue uno de los primeros hongos entomopatógenos en ser descritos. Este hongo es conocido desde 1836 como el agente causal de la “muscardina blanca” en los gusanos de la seda *Bombix mori* L, desde entonces es considerado como un organismo importante en el control microbiológico de insectos. El hongo fue descubierto por Bassi de Iodi, el cual a su vez mostró la naturaleza patogénica y contagiosa del hongo infectando el gusano de la seda y también desarrollo medidas para controlar la enfermedad. *Beauveria bassiana* es conocido por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica. Su patogenicidad se ha probado contra más especies de insectos que cualquier otro hongo (Bustillo, 1991 citado por Gallegos et al, 2003). En su honor, Bálzano describe y nombra al hongo *Botrytis bassiana*, por su parte Vuillemin (1912), menciona dos especies de *Beauveria*: *B. bassiana* y *B. brogniartii* (tenella) que atacan a todos los grupos de insectos (Rosas, 2000).

4.1.2 Morfología

Beauveria bassiana: Tiene conidios globosos o subglobosos, conidióforos formando densos cachos, posee una capa de micelio blanco algodonoso que envuelve al insecto, con granulaciones pequeñas del mismo color. En el medio de cultivo se describe como una colonia blanca de apariencia algodonosa y esponjosa, en la que se denotan pequeñas esferas (como nieve) de color crema pálido en la parte inferior. Puede ser capaz de iniciar epizootias a densidades altas y bajas del hospedero (Alves, 1986).

4.1.3 Taxonomía

Reino: Mycetae

División: Amastigomicotina

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hypomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliacea

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

(Alexopoulos y Mims, 1979; Mc Coy et al, 1988; Samson, 1988, citado por Gallegos et al, 2003)

4.1.4 Patogenicidad y virulencia.

Patogenicidad es la capacidad de un organismo de provocar una enfermedad. Es un atributo cualitativo, es decir, un microorganismo puede o no ser patogénico. Otro término utilizado es virulencia, este se refiere a la intensidad o grado de la enfermedad, este parámetro es relativo y tiene que ser comparado con otras cepas sobre el mismo hospedero. La virulencia es expresada como porcentaje de mortalidad en dosis letal cincuenta (DL50) o concentración letal cincuenta (CL50) (Nelson, 1977 citado por Lecuona, 1995).

Estudios realizados con 14 cepas de *Beauveria bassiana* para evaluar su patogenicidad sobre *Anthonomus grandis* con concentraciones de 1×10^8 conidias/ml, y de los 14 aislados, 6 presentaron valores de mortalidad mayores del 90%, 5 presentaron mortalidades del 70% y 4 cepas mortalidades del 89% (Quiroz et al 1994).

Trabajos de patogenicidad realizados en los Estados Unidos sobre *Cosmopolites sordidus* obtuvieron resultados entre 33-68% de mortalidad (Kaaya et al 1993, citado por Jiménez 1994).

Otros trabajos de patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill sobre *Anthonomus grandis* con una concentración de 1×10^8 dieron como resultado que las cepas 64/88 y 341535 son promisorias con una mortalidad mayor al 80% y esporulación mayor al 20 % y el tiempo letal 50 de 10.5 días, siendo el limite inferior de 8.72 días y el superior de 12.64 días (Gómez, 1996).

4.1.5 Modo de acción de *Beauveria bassiana*.

Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis. Estos hongos producen sustancias líticas y toxinas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa de los insectos, aún cuando muchas de estas toxinas se producen solo en el interior del insecto. Se ha demostrado que muchas especies de hongos pueden

producir durante su reproducción metabolitos bioactivos con efectos insecticidas, lo que potencia su acción.

Según Alves (1986) las etapas en el desarrollo de una micosis pueden simplificarse en las siguientes:

- 1) Germinación del conidio.
- 2) Formación de apresorio.
- 3) Penetración.
- 4) Colonización.
- 5) Reproducción del patógeno.

Germinación.

Una buena germinación ocurre en 12 horas a temperaturas de 23-30 °C y una humedad relativa de 80%, requiriendo fuentes de nitrógeno, carbono y energía, para la formación del tubo germinativo.

La habilidad del hongo para utilizar estos elementos esta en función de su agresividad, virulencia, cantidad de esporas (requeridas para matar), tiempo de germinación y penetración después a la adhesión de la cutícula del hospedero.

Hay evidencia que indican, que ciertos aislamientos de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, pueden germinar en agua, y la mayoría de ellos sugieren la adhesión de nutrientes, como son las fuentes de carbono y nitrógeno (Clark, 1986 Smith y Grula, 1981, Leger, 1991 citado por Rosas, 2000).

Formación de apresorio.

En la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura denominada apresorio, esta estructura se presenta en *Beauveria*, *Nomurae* y *Erynia*, este tubo germinativo penetra por aberturas naturales del insecto (tráqueas, poros y regiones intersegmentales).

Penetración.

El crecimiento superficial de los hongos entomopatógenos, previo a la penetración de la cutícula es variable, generalmente ocurre en 24 horas, los estímulos que causan la orientación del tubo germinativo de la espora a través de la cutícula, indican alguna forma de reconocimiento químico como prerrequisito para la penetración.

La penetración se divide en dos procesos:

- 1) Físico: Es cuando las hifas rompen áreas membranosas o esclerosadas.
- 2) Químico: Es cuando el hongo produce enzimas como las proteasas, lipasas y quitinasas, que facilitan la penetración mecánica.

Alrededor del área de penetración, aparecen síntomas de histólisis (descomposición de tejidos por la acción de enzima). El aparato bucal, ano, regiones ínter segmentales son probablemente las áreas más comunes de penetración.

Una penetración vía oral puede ocurrir con los siguientes hongos: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, en *Anticarsia gemmantalis* y *B. bassiana* en *Solenopsis sp.*

Colonización.

A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización de hospedero, en ese momento se forman pequeñas colonias de cuerpos hifales que se van engrosando y ramificando, la colonización inicia en el hemocele del insecto y luego pasa al resto del cuerpo como: sistema digestivo, cuerpos grasos, tubos de malpighi, sistema nervioso, músculos y traquea. El tiempo de colonización puede variar entre 76-120 horas dependiendo del patógeno, del insecto y las condiciones ambientales.

Reproducción del patógeno.

Después de 4-5 días de muerto el insecto comienzan a emerger las hifas por los espiráculos y regiones inter segmentales y después de 24-48 horas de emergencia de las hifas se inicia la formación de conidias, esto se logra dependiendo del patógeno, temperatura, humedad y radiación ultravioleta.

4.1.6 Síntomas.

Los síntomas iniciales de las enfermedades pueden aparecer como manchas oscuras en las patas, regiones intersegmentales y distribuidas por todo el tegumento. El insecto deja de alimentarse tornándose flaco y desorientado. Posteriormente el tegumento se torna rosado dependiendo del hongo (*B. bassiana* o *M. anisopliae*), para después tomar una coloración blanquisca, debido al crecimiento del micelio. Este cubre toda la superficie del cuerpo, iniciando por los espiráculos y áreas intersegmentales. El crecimiento se da por condiciones de temperatura y humedad favorable. La esporulación y conidiogénesis del hongo que pueden ser reconocidas por la formación polvorienta que recubre todo el cuerpo del cadáver. El cadáver presenta en esta fase coloración variable conforme la especie de hongo que causa la enfermedad (Alves, 1986).

4.2. Reproducción del hongo *Beauveria bassiana*.

Para iniciar el proceso de producción de los hongos entomopatógenos se utilizan medios de cultivos, los cuales son preparaciones sólidas, semilíquidas o líquidas que suplen de las necesidades nutricionales para el desarrollo del hongo.

Las exigencias nutricionales dependen del tipo de hongos en estudio, pero en general se deben considerar los siguientes elementos:

- 1) Agua; que participa en todos los intercambios iónicos que ocurren dentro y fuera del organismo.

- 2) Las fuentes de carbono, que se utilizan como fuente de energía, los más comunes son: carbohidratos, grasas y proteínas.
- 3) Fuentes de nitrógeno; que se obtiene a través de sales de nitrógenos, peptona, potasio, azufre, sodio, amonio, o cloruro de amonio.

Existen otros elementos no menos importantes para el desarrollo del hongo estos son los macro nutrientes como: fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro, hierro y micro nutrientes como: zinc, magnesio, cobalto y cobre.

4.2.1 Clasificación de medios de cultivos

- 1- Su uso, en medios comunes son aquellos que poseen nutrientes generales que sirven para el crecimiento de una amplia gama de hongos y medios especiales cuyos componentes son específicos para el crecimiento de ciertos hongos y son llamados también medios selectivos.
- 2- Su origen, en medios naturales son aquellos medios realizados con sustancias naturales como leche, carne, sangre, arroz, trigo, papa y medios artificiales, que son preparados de forma química en presentaciones generalmente en polvo.
- 3- Su consistencia, se dividen en medios sólidos, al medio se le adiciona un agente aglutinante como gelatina o agar y medios líquidos, tiene la misma composición del sólido excepto los agentes aglutinantes.

4.2.2 Medios de cultivos más utilizados

Los medios mas utilizados en patología de insectos son: **SDA** (Sabouraud-dextrosa-agar) **SDAY** (Sabouraud-dextrosa-agar-extracto de levadura), **SMAY** (Sabouraud-maltosa-agar-levadura), **MEA** (Extracto-malta-agar), **PDA** (Papa-dextrosa-agar), **APA** (Agar-papa-azúcar), **AA** (agar-agua), **AAA** (Agar-agua-acidificado), **NA** (Agar-nutritivo). El medio mas utilizado para la producción de hongos entomopatógenos es **PDA**, el cual puede ser

elaborado en laboratorio o ya viene preparado. El **PDA** preparado en laboratorio lleva 300 gramos de papa, las cuales son hervidas para obtener una infusión que se le agrega 20 gramos de dextrosa y 20 gramos de agar y luego es sometido a esterilización a 121⁰C por 20 minutos. Cuando ya viene preparado se agrega 38 gramos por litro de agua y luego se esteriliza (Alves, 1986).

Una vez que se ha seleccionado el medio de cultivo adecuado se pasa a la inoculación del hongo en el medio de cultivo para que las estructuras reproductivas inicien su crecimiento. Las fuentes de inóculo más comunes son las naturales como el suelo, material vegetal, insectos momificados y fuentes artificiales como cultivos puros, matrices, material preservado y bolsas. (Alves, 1986).

4.2.3 Proceso de producción masiva de hongos:

Para iniciar la producción masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conidias y/ o esporas) se utilizan substratos como maíz, arroz, trigo, soya, fríjol, cebada, sin embargo, los que han dado los mejores resultados son arroz y trigo. Existen tres métodos para la producción masiva del hongo, la producción industrial, semi industrial, y artesanal; de los tres procesos la producción semi industrial ha sido el método mas utilizado, este consiste en varias etapas que a continuación describiremos.

1) Aislamiento del hongo.

Consiste en la obtención del hongo apartir de la fuente de inóculo.

2) Elaboración de cultivos puros (6 días).

Consiste en la limpieza de los platos inoculados y el reaislamiento a partir del inóculo original.

3) Preparación de matrices y bolsas.

En la matriz se utiliza 100 g de arroz precocido entero como sustrato, el cual es colocado en erlenmeyer de vidrio, se sella y se esteriliza a 121⁰C. por 20 minutos. Las bolsas son de

material autoclavable (polipropileno) se les coloca 200 g de arroz y 10 ml de agua y se esteriliza a 121⁰C. por 20 minutos.

4) Inoculación e incubación de matrices (6 días).

El objeto de producir matrices es tener suficiente material para inocular las bolsas. Las matrices se inoculan tomando un plato con cultivo puro, el cual es raspado y se le agrega 60 ml de agua destilada, esto es suficiente para inocular 4 matrices. Las matrices son incubadas por 8 días en cuartos oscuros a una temperatura entre 24 a 28⁰C.

5) Inoculación e incubación de bolsas (4-6 días).

Las bolsas son inoculadas a partir de las matrices a las cuales se les agrega 750 ml de agua destilada con extravon al 0.1%. Cada bolsa es inoculada con 20 cc de la suspensión fungosa, con una matriz se inoculan aproximadamente 37 bolsas, las cuales son incubadas por un período de 4 a 6 días.

6) Proceso de secado (15 días).

El objetivo de esta fase es la eliminación de la humedad del hongo. El arroz contenido en las bolsas es depositado en bandejas plásticas grandes con orificios en el fondo y colocadas a temperatura ambiente para secar. El hongo está listo cuando tiene 4 a 6 % de humedad.

7) Cosecha del hongo (1 día).

La cosecha consiste en separar el sustrato (arroz) de las estructuras del hongo y recolectarlas en forma de polvo de conidias. Generalmente existen equipos mecánicos para la cosecha pero en Nicaragua se realiza utilizando cribas de diferentes numeración para separar por frotación las partículas del hongo del sustrato. Una vez cosechado debe mantenerse en refrigeración ya que la luz, humedad y altas temperaturas afectan la actividad de las conidias. (Gómez, 1996).

Después de cosechado es necesario evaluar el rendimiento, el cual se refiere a la cantidad de gramos de polvo de conidias cosechado, al número de conidias por gramo de polvo y a la viabilidad de las conidias.

8) Formulación (1 día).

La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo (conidias) se mezcla con materiales inertes los más utilizados son: Vehículos, solventes, protectantes, emulsificantes y aditivos (Barrientos, 2002). Esto se hace con el objetivo de homogenizar las partículas del hongo para poder manipularlas y aplicarlas adecuadamente.

Hasta el momento se han desarrollado 2 tipos de formulaciones en polvo mojable y líquido emulsificable. Los materiales utilizados en la formulación deben presentar algunas características como:

No tener actividad biológica.

Inocuo al medio ambiente.

Características físicas adecuadas para mezclarse.

Facilitar la aplicación del producto.

No afectar la actividad del hongo.

Económicamente rentable.

Para finalizar el producto debe ser empacado en recipientes que no permitan la entrada de luz y la humedad ya que estas afectan la actividad y calidad del producto.

4.2.4 Características o propiedades de un patógeno para ser efectivo como bioinsecticida.

El paso inicial para desarrollar un insecticida microbiológico es la selección de un aislamiento que sea altamente patogénico y virulento para la plaga a controlar y que tenga un rango de temperatura similar al de la plaga. Para que los patógenos sean efectivos como bioinsecticidas y pueda realizarse su comercialización, deben poder producirse de manera fácil y barata, deben ser de bajo riesgo, específicos para la plaga a controlar, deben poder

aplicarse utilizando tecnologías convencionales de manera que puedan tener un período de vida adecuado en almacén y deben ser de rápida acción.

(Goettel y Roberts, 1992, Milner, 2000, Milner y Hunter, 2001, citado por Moreno, 2003).

Uno de los descubrimientos que facilitó el desarrollo de *Beauveria* como micoinsecticida es que las conidias son hidrofóbicas y liposolubles, por lo tanto pueden suspenderse en aceite fácilmente. Los aceites se pueden dispersar y penetrar la epicutícula de los insectos, ya que tiene una alta proporción de cera, y evitar la deshidratación de las conidias favoreciendo la germinación cuando la humedad relativa es baja. Esta característica ha permitido desarrollar la tecnología para formular en aceite vegetal o mineral las conidias del hongo *Beauveria* (Prior et. al, 1992, Lomer et. al, 2001, Milner y Hunter, 2001, citado por Moreno, 2003).

4.2.5 Ventajas de hongos entomopatógenos.

Los agentes microbiológicos, en particular los hongos entomopatógenos, ofrecen varias ventajas en el control de plagas: bajos costos de producción, bajo impacto ambiental, en particular no tiene efectos secundarios sobre organismos acuáticos y animales de sangre caliente, son mas selectivos que los productos químicos, adecuados para utilizarse en áreas de producción orgánica y áreas protegidas, la eliminación de residuos es relativamente fácil, basta con exponer el producto un par de días al sol para que las esporas se inactiven casi totalmente. (Milner y Hunter; 2001, Jenkin et al, 1998, citado por Moreno, 2003).

4.2.6 Impacto ambiental de los hongos entomopatógenos.

Algunos hongos entomopatógenos son bastantes específicos, diversos estudios sobre efectos secundarios han indicado que no se pone en riesgo a organismos acuáticos, poco o ningún impacto sobre artrópodos terrestres y no afectan vertebrados o animales de sangre caliente (aunque se recomienda usar el equipo de protección adecuado y no inhalar las esporas), también se señala que no hay efectos notables de *B. bassiana* en insectos

voladores (dípteras, himenópteras, lepidópteros, neuroteras y coleópteros), sin embargo, las abejas cortadoras de hojas de alfalfa son altamente susceptibles a *B. bassiana*.

La FAO recomienda el uso de micoinsecticidas en áreas sensibles. Aunque los trabajos de investigación realizados a la fecha indican bajos o ningún impacto ambiental de hongos entomopatógenos. Es necesario estudiar con precisión el efecto de los micoinsecticidas disponibles sobre insectos que no son plaga y coexisten con especies plagas, a las que se dirige el control. (Milner y Hunter, 2001; Kooyman et. al, 1997; Milner, 2002, citado por Moreno, 2003).

4.2.7 Uso actual y futuro de hongos entomopatógenos.

La tecnología para formular y aplicar hongos entomopatógenos en forma eficiente y efectiva ha sido desarrollada. Sin embargo, ésta tecnología necesita ser transferida a países en desarrollo donde los costos económicos y ambientales por la aplicación de productos químicos son extraordinarios. Países como México y Brasil están tratando de desarrollar su propia tecnología para el uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas usando aislamientos nativos y evitando la introducción de cepas exóticas.

Las autoridades responsables de la sanidad vegetal en países en desarrollo deben propiciar la transferencia de tecnología, lo cual permitirá que extensionistas con productores y técnicos de campo se familiaricen con el uso, aplicación y bondades de productos biológicos, sobre todo como un elemento importante en Programas de Manejo Integrado.

Otro aspecto importante a considerar para lograr el éxito de hongos entomopatógenos, es el estudio del comportamiento, actividad diaria y capacidad termorregulatoria de las especies plagas a controlar pues muchas de ellas pueden inactivar el efecto del entomopatógeno (Milner et. al, 2001, citado por Moreno, 2003).

4.3 Estudio realizado en México con blastosporas

En México se realizó un estudio de producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* en medio líquido para control de *Amphidees latipens* (picudo de la yema del manzano) se llevó a cabo aislando y purificando una cepa de *B.bassiana* a partir de una muestra de adultos de picudo de la yema del manzano recuperado de San Antonio de las Alazanas, Arteaga, Coahuila.

Este aislado se inoculó en diferentes medios de cultivo líquidos conteniendo Harina de soya, Harina de frijol, Harina de Haba y Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS), para su crecimiento y producción de blastosporas en cada medio.

Los adultos del picudo de la yema del manzano fueron sumergidos durante veinte segundos en diferentes concentraciones de blastosporas para determinar el grado de virulencia, evaluándose de la mayor a la menor concentración (1×10^2 a 1×10^7).

Los resultados indicaron que las blastosporas producidas en el medio con harina de soya fueron las que provocaron la mayor mortalidad (92%) en el menor tiempo de ensayo (10 días), seguidas de las blastosporas producidas en los diferentes medios de cultivo provocaron la mortalidad del 100% del picudo del manzano a partir de los 15 días del ensayo (Gallegos, G. 2003).

V. MATERIALES Y METODOS

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de hongos entomopatógenos del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, ubicado en el Campus Agropecuario de la UNAN-León a 1.5 km. entrada a La Ceiba, en el período comprendido del mes de Junio a Noviembre del 2005. El estudio se llevó a cabo en diferentes fases las cuales se describen a continuación:

5.1 Inoculación y producción de la cepa.

La cepa seleccionada tiene el código 114, es un aislado de *Beauveria bassiana*, colectada en Nueva Segovia sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. Se encontraba conservada en sílice - gel, tiene un tipo de crecimiento uniforme con producción de conidias sueltas y crece muy bien en extracto de malta agar y papa dextrosa agar (Quiroz, 1994).

Para iniciar el proceso de producción se pusieron gránulos de sílice - gel conteniendo las conidias del hongo en medio de cultivo, Papa Dextrosa Agar (PDA). Los platos inoculados fueron colocados a temperatura de 25 °C para su crecimiento (Incubación).

Las observaciones del crecimiento de la cepa se realizaron diario para eliminar los platos con contaminantes. Hasta que el hongo alcanza la madurez en un término aproximado de 10 días.

5.1.1 Elaboración del medio líquido.

El medio a utilizar es Papa Dextrosa (PD), cuya elaboración consistió en lavar y pelar 300 g de papa, cortándose en trozos pequeños, los cuales se pusieron a hervir por 25 minutos, hasta obtener la infusión, luego se filtró utilizando un embudo con algodón en su base para no dejar pasar resto de papa, después de enfriar se le agregó 20 g de dextrosa, se mezcla bien y el medio se distribuyó en los 8 erlenmeyer colocando 100 ml en cada uno, se sellan y luego se ponen a esterilizar en la olla de presión a 121⁰ C, 15 libras de presión por 15 minutos.

5.1.2 Siembra del hongo.

Se inició tomando un cultivo puro de la cepa 114 de *Beauveria bassiana*, con ayuda de una espátula se cortó un trocito del medio de cultivo sólido conteniendo el hongo y se colocó en el medio de cultivo líquido. Una vez depositado el implante del hongo se colocaron los erlenmeyer en el agitador a 150 rpm (revoluciones por minuto). Cada erlenmeyer se marcó con la fecha y la hora de lectura.

El conteo de blastosporas se realizó desde: 0 hora, 3 horas, 9 horas, 21 horas, 43 horas, 57 horas, 69 horas y 120 horas.

Los datos del conteo se registraron en un formato con las siguientes variables:

-Fecha.

-Hora.

-Número de blastosporas.

5.1.3 Conteo de blastosporas.

El conteo de blastosporas se realizó tomando muestras del hongo de cada erlenmeyer y se colocaron en el hemocitometro (cámara de Neubauer), utilizando los cuadros pequeños que tienen un factor de 10^6 , se contaron 5 puntos de la cámara, los extremos y el centro para hacer un total de 25 cuadros pequeños y 4 repeticiones por muestra. Se utilizó la fórmula propuesta por Alves (1986) para obtener la concentración total de la suspensión.

Fórmula utilizada es la siguiente:

$X * 25 * 4 * 10^6 * \text{Volumen de la dilución}$.

Donde X: Promedio de conidias de las cuatro repeticiones.

25: Número de cuadrantes contados.

$4 * 10^6$: Factor de los cuadrantes pequeños (Diámetro/ Profundidad /Volumen).

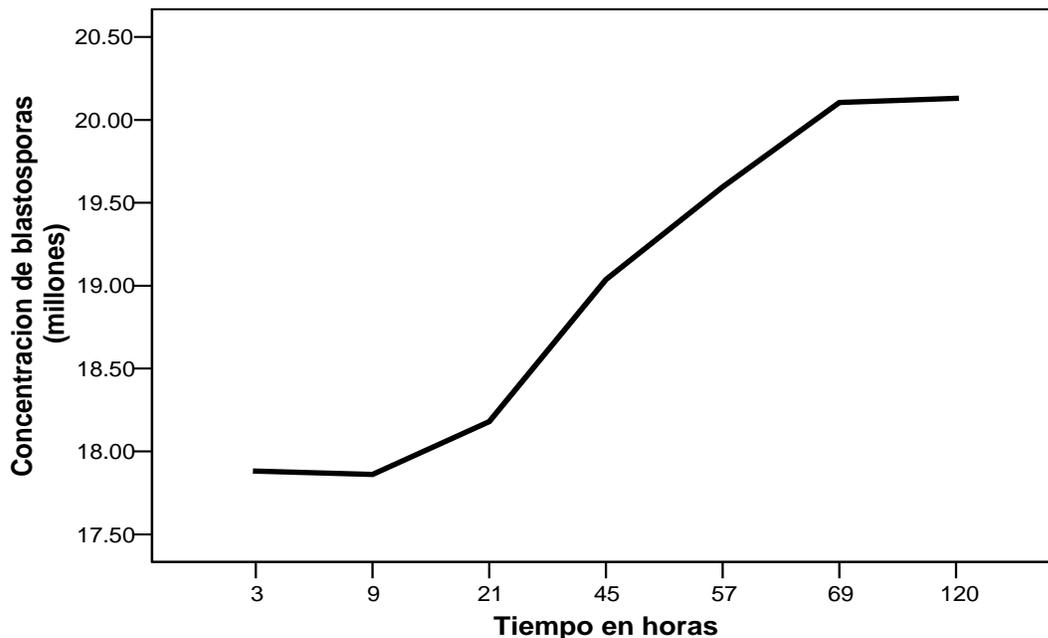
El diseño utilizado fue un D.C.A (Diseño Completamente Aleatorio), efectuándose un análisis de varianza para determinar si las diferencias entre los grupos (horas) son significativas o si se puede atribuir al azar. El análisis de varianza se realizó para contrastar la hipótesis de que al menos dos de las medias eran iguales. Utilizamos los contrastes de las pruebas Post hoc para determinar que las medias difieren, a nivel de significancia de 0.05.

La transformación de los datos proporcionan un medio de modificar variables por una o dos razones, corregir el incumpliendo de los supuestos estadísticos subyacentes a las técnicas multivariantes o mejorar la relación (correlación) entre variables. Las transformaciones de los datos pueden basarse en razones tanto teóricas (transformaciones cuya conveniencia se basa en naturaleza de los datos) como derivada de los datos (donde las transformaciones surgen a partir de un examen de los datos). Así en cada caso el investigador debe proceder muchas veces por ensayo y error ponderando la mejora frente a la necesidad de transformaciones adicionales.

Los resultados y discusión de los datos se presentan en forma de tablas y gráficos los cuales fueron elaborados en programas de EXCEL y SPSS.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del estudio fueron analizados a través de análisis de varianza, sin embargo para poder realizarlo se tuvo que determinar primero si los datos cumplen los supuestos del ANDEVA. El análisis del test de Levene nos indica que el valor de P (2.55) es mayor que el valor del alfa al 0.05 (0.051), por lo cual aceptamos el supuesto de homogeneidad.(ver Anexo 2).Esto indica que los datos pueden ser analizados a través del ANDEVA, por lo que procedimos a realizar el análisis de varianza, para conocer si hubo diferencias significativas entre repeticiones y entre las horas en que se tomaron los datos.



Gráfica No 1. Variación de la concentración de medias de blastosporas en el tiempo.

Para evaluar la calidad de la producción de hongos en un medio sólido, el cual es el más utilizado en el país, se toma en cuenta la viabilidad, concentración y la pureza (Alves,

1986). En el estudio se tomaron en cuenta los dos últimos parámetros, es decir la concentración de blastosporas y la pureza.

Uno de los principales elementos que se toman en cuenta para determinar la calidad del hongo son las concentraciones de blastosporas. En el estudio, las concentraciones oscilaron entre 10^7 - 10^9 blastosporas por mililitro. Estos resultados se encuentran dentro del rango obtenido por Gallego, (2003), el cual encontró concentraciones similares a las obtenidas en nuestro estudio. Por lo que podríamos afirmar que el método utilizado es eficiente ya que coincide con otro estudio realizado por Gallego en el 2003.

Un segundo elemento que fue tomado en cuenta en nuestro estudio fue el nivel de contaminación causados por hongos o bacterias contaminantes. En el ensayo se obtuvo niveles de contaminación del 0 %, lo que demuestra alto grado de pureza, alcanzado por las blastosporas obtenidas. En el caso de conidias se tolera un 20 % de contaminación (Alves, 1986), este porcentaje es bastante alto si se compara con los niveles obtenidos en el estudio.

Tabla 1. Análisis de varianza entre grupos de horas y repeticiones.

ANOVA

CONCETRA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	24.265	6	4.044	15.723	.000
Intra-grupos	5.402	21	.257		
Total	29.667	27			

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas entre el número de blastosporas producidas en cada intervalo de tiempo. Las concentraciones de blastosporas en las primeras 45 horas no son significativas cuando se les compara con las producidas en los tres últimos conteos (57 h, 69 h, y 120 h). (Ver Anexo 3). El gráfico 1 demuestra que aún cuando hay un aumento constante en las concentraciones de blastosporas en todos los conteos realizados, es a partir de las 57 horas y el aumento de las mismas es lo suficientemente grande como para mostrar significancia.

Consideramos que la razón por la cual el hongo aumentó la producción de blastosporas a las 57 horas después de haber sido inoculado en el medio de cultivo, es porque en ese momento alcanza su madurez fisiológica y esa puede ser la razón por la cual la producción de blastosporas es significativamente mayor.

Tabla No 2. Costos de insumos para la producción de blastosporas en medio líquido (PD)

DESCRIPCION	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo	4to ensayo	CANT.	C/U	TOTAL DOLARES
Alcohol	½ litro	½ litro	½ litro	½ litro	2 litros	1.76	7.04
Papel toalla	1 rollo	-	-	-	1 rollo	0.64	0.64
Papel aluminio	1 rollo	-	-	-	1 rollo	0.82	0.82
Algodón	1 lb	-	-	-	1 lb	2.70	2.70
Papa	1 lb	1 lb	1 lb	1 lb	4 lb	0.41	1.64
Encendedor	1	-	-	-	1	0.47	0.47
Detergente	1	1	1	1	4	0.07	0.28
Gasas	1	1	-	-	2 paq	1.17	2.34
Masking- tape	1	-	-	-	1	0.47	0.47
Dextrosa	20 g	20 g	20 g	20 g	80 g	0.485	1.94
Otros							
Total							\$ 18.34

En la tabla No 2, se reflejan los costos de insumos obtenidos en los 4 ensayos de producción de blastosporas con un valor de \$ 18.34. Para producir de 80 bolsas por cada 100 ml en las cuales se utilizaron en 800 ml de medio para obtener un total de 2560 bolsas. Del cual se podría tener un ingreso de \$5120 dólares.

CONCLUSIONES

- La cepa 114 de *Beauveria bassiana* es capaz de producir blastosporas en medio líquido a partir de las primeras 3 horas de agitación. Sin embargo, el análisis estadístico indica que es a partir de las 57 horas que la producción de blastosporas aumenta de manera significativa.
- El proceso de producción de blastosporas en medio líquido mostró muy buena calidad ya que las concentraciones de blastosporas fueron altas, oscilando entre 10^7 y 10^9 blastosporas por mililitro y la contaminación fue 0 %.
- El costo de insumos para la producción de blastosporas en medio líquido fue de \$ 18.34 dólares, con este costo se podría producir 800 bolsas en los 4 ensayos realizados.

RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo estudios de viabilidad de las blastosporas en laboratorio y en campo.
2. Llevar a cabo estudios de patogenicidad y virulencia en laboratorio y campo.
3. Realizar estudios comparativos con diferentes medios líquidos para observar el crecimiento de blastosporas y determinar su eficiencia en su producción.

BIBLIOGRAFIA

- Alves, S. B. 1986. Controle Microbiano de Insetos. Editora, Manole, Ltda. Pág. 99-104.
- Barrientos L. Uso de hongos Entomopatógenos en el control de plagas en campo comercialización, uso actual y futuro de hongos Entomopatógenos, Curso de patología de Insectos, Ciudad Victoria Tamaulipas, México, 2002. 40 Pág.
- Carballo, M. y Guaharay, F. (2004). Control Biológico de Plagas Agrícolas. 34 – 46 Pág.
- Gallegos G. et al Entomopatógenos, Trillas, México 2003. 141 Pág.
- Gómez M. Evaluación de la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria bassiana* y 10 cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre el picudo del algodón. León Nicaragua. Tesis UNAN-León 1996. 45pag.
- Jiménez C. Uso de hongos Entomopatógenos para el manejo del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*). Editado por CATIE- INTA/ MIP. (NORAD-ASDI). Informe final del proyecto Hongos Entomopatógenos Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario, MAG.1991-94. Managua Nicaragua. 3 Pág.
- Lecuona, R. (1995.) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. 8 Pág.

- Moreno. L. Espino.E. Evaluación de la eficacia de control de *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill en picudo Negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (GERMAR), (Coleoptera Cucurlionidae) Tesis de Ingeniería Agroecológica. 2002 - 2003. 46 Pág.
- Olayo P.R.P. (1993). Evaluación y formulación de aislados nativos de *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. Para el control del complejo de picudos del manzano *Amphidees* spp. (Coleoptera: curculionidae) de la sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Maestría. UAAAN. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 102 Pág.
- Quiroz I. et al. Disponibilidad de aislados Patogénicos de hongos Entomopatógenos para el manejo de plagas insectiles de importancia de la región. Editado por CATIE-INTA / MIP. (NORAD- ASDI). Informe final del proyecto Hongos Entomopatógenos Centro Nacional de Diagnostico Fitosanitario, MAG. 1991-94. Managua Nicaragua, 1994. 10 Pág.
- Roberts D W. 1989. World Picture of biological control of insects by Fungi. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro Pág. 89- 100.
- Rosas. J. Hongos Entomopatógenos. Curso Internacional de Patología de Insectos, Ciudad Victoria Tamaulipas, 2000. 35 Pág.
- Sánchez R. (2002). Efecto de una formulación de *Beauveria bassiana* con citrolina, para el control del complejo de *Amphidees* spp (Coleoptera: Cucurlionidae) en manzano, en la sierra de Arteaga, Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 52 Pág.
- Taller de producción y uso de hongos entomopatógeno (UNA –CATIE/ INTA – FAITAN). Managua, Abril 2000. 49 Pág.

ANEXOS

ANEXO I

Equipos utilizados en la producción de blastosporas en medio líquido.

DESCRIPCION	CANTIDAD	C/U	TOTAL EN DOLARES
Soporte	1	67.05	67.05
Cámara de Neubauer	1	15	15
Cámara flujo laminar	1	3.895	3895
Agitador	1	1.316	1316
Erlenmeyer de 1000ml Pyrex	8	7.15	57.2
Cubre objeto	5	8.50	42.5
Mechero de alcohol	1	3.50	3.50
Balanza	1	130	130
Pipeta pasteur desechable	8	0.50	4
Probeta	1	19.39	19.39
Microscopio	1	1405.00	1405.00
Autoclave	1	800.44	800.44
Cocina eléctrica	1	20	20
Beaker	1	15.5	15.5
Espátula	1	11.23	11.23
Embudo	1	17.6	17.6
Incubador	1	795	795
Guantes	1	20.55	20.55
Otros			
Total			8634.87

ANEXO 2

Prueba de homogeneidad de varianzas

CONCETRA

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.552	6	21	.051