

EFICIENCIA DE SUSTRATOS SOBRE LA ESPORULACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp.¹

Cristhian Javier Grabowski Ocampos²

Aida Lorenza Orrego Fuente³

Alfredo Daniel Stauffer Bonzon³

ABSTRACT

With the objective to evaluate the incidence of substrates on the production of spores in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces* sp. was conducted the present work. The experiment were conducted in the Laboratory of the Departamento of Vegetable Protection of the Faculty of Agrarian Sciences of the National University of Asunción, Campus of San Lorenzo. The used experimental design was the one of totally at random with 8 treatments and one witness. The treatments were, rice + molasses, rice + yeast + molasses, rice + yeast + sugar, rice + flour of corn + molasses, rice + flour of corn + sugar, rice + chopped cane of sugar, rice + flour of corn + chopped cane of sugar and a compound witness for rice + sugar. The incubation went to a temperature of 27 °C without light, during 20 days. The evaluation was carried out using the camera of Neubauer. The results demonstrate that, *Beauveria bassiana* obtained the but high concentration of spores (16.50×10^6 spores/ml) in the means of cultivation composed by rice + chopped cane of sugar. *Metarhizium anisopliae* reaches the but high concentration (45.77×10^6 spores/ml) on the compound substrate for rice + flour of corn + chopped cane of sugar. The compound sustrato for rice + flour of corn + sugar the one that I reach the was but high production of spores in *Paecilomyces* sp. (666.7×10^6 spores/ml.).

Key words: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* sp., substrates, entomopathogenic fungi, camera of Neubauer.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la incidencia de sustratos sobre la producción de esporas en los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp. se realizó el presente trabajo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 8 tratamientos y uno considerado testigo. Los tratamientos evaluados fueron, arroz + melaza, arroz + levadura + melaza, arroz + levadura + azúcar, arroz + harina de maíz + melaza, arroz + harina de maíz + azúcar, arroz + caña de azúcar triturada, arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada y un testigo compuesto por arroz + azúcar. La incubación fue a una temperatura de 27 °C sin luz, durante 20 días. La evaluación fue realizada utilizando la cámara de Neubauer. Los resultados demostraron que *Beauveria bassiana* produce elevada concentración de esporas (16.50×10^6 esporas/ml) en el sustrato compuesto por arroz + caña de azúcar triturada. *Metarhizium anisopliae* alcanzó la más elevada concentración (45.77×10^6 esporas/ml) sobre el sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada. El sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + azúcar *Paecilomyces* sp. es el que alcanza la mayor producción de esporas (666.7×10^6 esporas/ml.).

Palabras Clave: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* sp., sustratos, hongos entomopatógenos, cámara de Neubauer

¹ Parte de la Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, FCA-UNA

² Ing. Agr. Egresado de la FCA-UNA, Orientación Protección Vegetal

³ Prof. Ing. Agr., Docente Investigador del Departamento de Protección Vegetal de la FCA-UNA

INTRODUCCIÓN

La idea de controlar los insectos por medio de epidemias artificiales inducidas se ha convertido en realidad y en el futuro será perfeccionada y ampliamente utilizada. Actualmente se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que afectan plagas de cultivos de importancia económica; muchos de ellos utilizados exitosamente en programas de control biológico.

Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre insectos y en forma saprofítica sobre material vegetativo en descomposición. Estos hongos tienen un gran potencial para ser empleados como biocontroladores.

Entre los principales hongos que presentan estas características se encuentran: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp. Esto ha sido propiciado por los problemas de resistencia de los insectos a los insecticidas, al interés de producir alimentos libres de residuos de productos químicos, de conservar el medio ambiente libre de contaminantes y de preservar la diversidad de especies que sufren el impacto negativo debido al uso indiscriminado de plaguicidas.

Recientemente los hongos entomopatógenos han cobrado interés por la posibilidad de producirlos masivamente y de formularlos en preparados estables que permiten su almacenamiento por largo tiempo, preservando su viabilidad y patogenicidad. Además, brindan la oportunidad de comercializarlos como biopesticidas.

No obstante, para que los entomopatógenos puedan ser utilizados a gran escala es necesario que se tenga alta producción de estos microorganismos. En virtud de este hecho, se justifica el interés por los estudios que buscan encontrar medios de cultivo o sustratos eficientes para su multiplicación.

Los hongos para ser utilizados en control microbiano de insectos en forma de insecticidas biológicos, deben disponibles en grandes cantidades. Los insectos, normalmente, necesitan de elevados potenciales de inóculos para así poder ser colonizados por los patógenos y por eso, para que ellos actúen como insecticidas microbianos y sean eficientes independientemente de la densidad poblacional de insectos, altas dosis deben ser empleadas (Alves, 1986).

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva de sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soja, pero los más utilizados son arroz y trigo (Monzón, 2001).

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el

cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Todos los medios de cultivo utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo de los hongos (Alean, 2003). Las diferentes características de los sustratos naturales hacen que la incidencia sobre el desarrollo y esporulación de los hongos entomopatógenos sea diferenciada. La porosidad, el volumen y el contenido de nutrientes son las principales características que benefician el desarrollo de los entomopatógenos. Muchas veces se hace difícil encontrar un medio de cultivo que cumpla con todas estas características.

Los sustratos, para que sean adecuados deben ser de bajo costo, de fácil preparado y eficientes en cuanto al desarrollo y esporulación de los entomopatógenos (Alvarenga et al., 1988).

En este contexto, el propósito principal del trabajo es de estudiar la eficiencia de diferentes sustratos naturales disponibles en nuestro medio, sobre la esporulación de los hongos entomopatógenos para su utilización como biopesticidas.

MATERIALES Y METODOS

Localización.

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología del Dpto. Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, perteneciente a la Universidad Nacional de Asunción, Campus Universitario de San Lorenzo, desde el mes de agosto hasta el mes de diciembre del año 2004.

Material biológico.

Los hongos controladores biológicos evaluados estuvieron compuestos de tres géneros diferentes: *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; *Paecilomyces* sp.

Material orgánico.

Los materiales orgánicos empleados en la multiplicación de los hongos entomopatógenos consistieron en los siguientes: arroz, azúcar, melaza, levadura (comercial), harina de maíz, y caña de azúcar picada. También se emplearon medios de cultivo con Papa - Dextrosa - Agar (PDA).

Propagación de los hongos.

Se inició con un cultivo puro al que se le denomina hongo patrón o semilla. Para la obtención de los cultivos puros se realizaron el repicaje de los tres entomopatógenos en placas de Petri a partir de cultivos originales que fueron proporcionados por el Departamento de Protección Vegetal, pertenecientes a la colección de hongos.

El repicaje consistió en la inoculación de los microorganismos en placas de Petri que contenían medio de cultivo PDA, de esta manera se obtuvieron cultivos puros que fueron el inóculo para iniciar la multiplicación en los sustratos preparados para el experimento. La incubación del cultivo se realizó en incubadora a una temperatura de 27°C durante 5 días. El mismo procedimiento general se efectuó para la multiplicación de las tres especies de hongos entomopatógenos.

Tratamientos.

Los tratamientos fueron determinados basándose en las diferentes proporciones que se emplearon de cada material orgánico y como testigo fue considerado aquel sustrato utilizado y recomendado básicamente en toda producción de hongos entomopatógenos que es el arroz. El experimento contó con 8 tratamientos, con 3 repeticiones para cada uno de los tres entomopatógenos, totalizando así 72 unidades experimentales. En la siguiente tabla se detallan los tratamientos.

Tabla 1. Descripción de los sustratos que fueron empleados en el experimento FCA/UNA, San Lorenzo, 2004.

Tratamientos	Proporción de los sustratos	CS (1)
T ₁ (testigo)	Arroz (100 g) + azúcar (10 g).	Aa
T ₂	Arroz (100 g) + melaza (10 cc).	Am
T ₃	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + melaza (10 cc).	Alm
T ₄	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + azúcar (10 g).	Ala
T ₅	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + melaza (10 cc).	Amzm
T ₆	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + azúcar (10 g).	Amza
T ₇	Arroz (50 g) + Caña de azúcar triturada (50 g).	Act
T ₈	Arroz (33 g) + maíz (33 g) + Caña de azúcar triturada (33 g).	Amzct

CS: Código de los Sustratos.

Preparación de Sustratos.

Los materiales orgánicos como arroz, azúcar, melaza, levadura, harina de maíz y caña de azúcar picada, empleados en los distintos tratamientos, fueron determinados con la utilización de una balanza, la cual sirvió para pesar las diferentes proporciones de cada sustrato o tratamiento.

Una vez pesadas las cantidades de cada material orgánico, se cargaron en una bolsa de polipropileno (resistente al autoclavado), 100 gramos de cada mezcla de sustrato preestablecido. Seguidamente en cada bolsa se agregó 70 ml de agua para llevarlas a esterilización en el autoclave a 120 °C y una atmósfera de presión durante 30 minutos.

La cantidad de agua adecuada fue determinada mediante pruebas a los sustratos con diferentes cantidades para

observar ciertas características deseables que deben adquirir un sustrato como ser: una consistencia suave, suelta, sin aglomerarse, para que permita un crecimiento homogéneo del hongo en los mismos. De esta manera fueron preparados todos los tratamientos. Posteriormente, bajo campana de aislación, con total asepsia, se pesaron 10 gramos de cada combinación del sustrato y se colocaron en placas de Petri (unidad experimental).

Una vez cargados las 3 (tres) placas de Petri para cada uno de los tratamientos, se procedió a la inoculación de los mismos con 3 (tres) discos de 5 mm de diámetro o cultivo puro del hongo desarrollado sobre medio de cultivo PDA. El mismo procedimiento fue realizado para cada uno de los entomopatógenos estudiados. Seguidamente todas las placas fueron llevadas a incubadora a una temperatura de 27 °C, sin luz, durante 20 días.

Métodos de Evaluación.

Transcurrido los 20 días de incubación de los tres hongos entomopatógenos en las placas de Petri, fueron retiradas de las condiciones descriptas para su evaluación.

Se procedió a cuantificar el número de esporas utilizando la cámara de Neubauer (French & Herbert, 1980) y un microscopio óptico con aumento de 40X.

Para preparar la suspensión de esporas, se realizaron diluciones de acuerdo al siguiente criterio: en recipientes de vidrio con tapa de 300 ml fueron depositados el contenido de cada una de las repeticiones de los tratamientos que se encontraban en las placas de Petri, a las cuales se agregó 100 cc de agua destilada y 1 cc de dispersante (tweem). Los frascos fueron agitados manualmente con ayuda de una espátula de metal por 1 minuto y con una pipeta fueron llevadas las alícuotas a la Cámara de Neubauer para poder determinar la concentración de esporas (número/ml) a través del microscopio óptico.

La determinación de la concentración de esporas en la Cámara de Neubauer de *Beauveria bassiana* consistió en el conteo de ocho cuadros secundarios de las fracciones del cuadro principal, cuantificando cuatro cuadros externos y los cuatro cuadros que rodean a la central, para luego, promediar las tres observaciones realizadas a cada repetición y multiplicar por un factor de conversión de 31250 (Figura 1).

Para los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces sp.* la concentración de esporas se determinó por el conteo de esporas de cinco cuadros secundarios, cuatro cuadros externos y un cuadro central. En este caso el factor de conversión es de 50000, este factor es multiplicado por el promedio de tres lecturas realizadas a las repeticiones de los tratamientos. La diferencia de factor mencionada se debe a la facilidad, rapidez de lectura y el tamaño de las esporas.

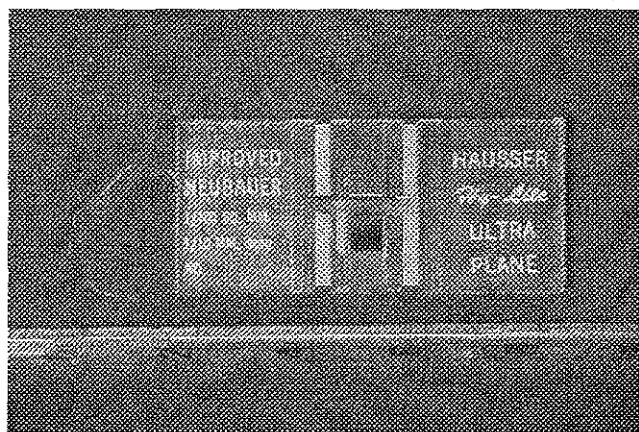


Figura 1. Cámara de Neubauer utilizada para la cuantificación de esporas de los tres hongos entomopatógenos. San Lorenzo, 2004.

Una vez realizadas las observaciones para cuantificar la concentración de esporas, se determinó el número de esporas producidas por las tres especies de hongos entomopatógenos y se procedió a comparar los resultados de los diferentes tratamientos.

Diseño Experimental.

El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con 8 tratamientos, todos con 3 repeticiones para cada uno de los tres entomopatógenos, totalizando 72 unidades experimentales. Cada placa de Petri fue considerada como una unidad experimental.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

Para realizar el análisis de varianza, los datos referentes al número de esporas producidas por los tres hongos entomopatógenos, fueron transformados a raíz cuadrada ($\sqrt{x}$), aplicándose el test de Tukey para los contrastes de medias, adoptándose el nivel de significancia de 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en los diferentes tratamientos empleados.

La Figura 2 y la Tabla 2 representan el comportamiento de *B. bassiana* en los diferentes tratamientos. Se puede apreciar que todos los tratamientos presentaron mínimas diferencias significativas

El análisis del ensayo dilucidó, que para *B. bassiana*, el sustrato compuesto por arroz + caña de azúcar triturada (Act) fue el de mayor producción, promediando 16.50×10^6 esporas/ml en contraste con los demás tratamientos, aunque el mismo no presenta diferencia significativa

entre los tratamientos compuestos por arroz + maíz + melaza (Amzm); arroz + maíz + azúcar (Amza) y arroz + maíz + caña de azúcar triturada (Amzct).

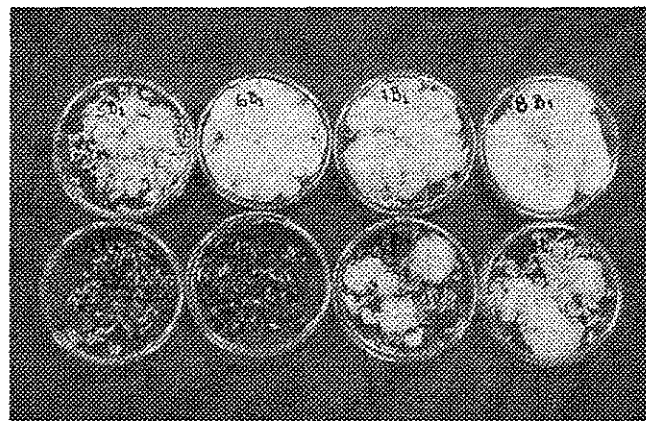


Figura 2. Crecimiento de *B. bassiana* en los diferentes tratamientos utilizados. San Lorenzo 2004.

Los sustratos compuestos por arroz + azúcar (Aa) y arroz + melaza (Am) son sustratos intermedios entre los de mayor y menor producción de esporas, siendo los compuestos por arroz + levadura + azúcar (Ala) y arroz + levadura + melaza (Alm) los que presentaron la menor producción.

Tabla 2. Promedio del número de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en los diferentes sustratos. San Lorenzo, 2004.

Código sustratos	Composición de sustratos.	PNE (1)	TT (2)
Act	Arroz (50 g) + Caña de azúcar triturada (50 g)	16.50×10^6	a
Amzm	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + melaza (10 cc)	12.55×10^6	a
Amza	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + azúcar (10 g)	11.45×10^6	a
Amzct	Arroz (33 g) + maíz (33 g) + C. azúcar tritur. (33 g)	11.10×10^6	a
Aa (testigo)	Arroz (100 g) + azúcar (10 g)	7.13×10^6	ab
Am	Arroz (100 g) + melaza (10 cc)	6.25×10^6	ab
Ala	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + azúcar (10 g)	2.64×10^6	b
Alm	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + melaza (10 cc)	1.54×10^6	b

C.V. (%): 19.7

(1) PNE: Promedio del número de esporas

TT: Test de Tukey: En las columnas, medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el Test de Tukey al 5%.

La concentración media de esporas obtenida por *B. bassiana* se mantuvo entre los 16.50×10^6 y 1.54×10^6 esporas/ml.

El efecto de los tratamientos sobre la esporulación de *B. bassiana* se separó en tres grupos. Los tratamientos compuestos por Act; Amzm; Amza y Amzct son los que produjeron elevadas concentraciones de esporas, sin diferencia significativa entre los mismos. Los tratamientos compuestos por Ala y Alm son los que produjeron menor incidencia sobre la esporulación de *B. bassiana*. Los mismos presentaron una diferencia significativa con relación a los tratamientos que produjeron altas concentra-

ciones de esporas del entomopatógeno.

Como transición a los dos grupos mencionados arriba, los sustratos compuestos por Aa (Testigo) y Am presentaron comportamientos similares. Los mismos, a parte del arroz, tuvieron como componente al azúcar y la melaza, sustratos con los cuales generalmente se multiplican entomopatógenos. El testigo, presentó una producción mayor de esporas que los compuestos por Alm y Ala, en los cuales se presentó la menor producción de esporas de *B. bassiana*. Posiblemente la presencia de levadura inhiba la producción de esporas como se puede observar en este estudio, considerando que los dos tratamientos cuyos sustratos estuvieron compuestos de levadura produjeron el menor número de esporas.

La concentración de esporas producidas en los sustratos, es una de las formas de evidenciar la potencialidad de los entomopatógenos para provocar patogenicidad en las plagas que ellos controlan, ya que esto es uno de sus mecanismos de acción (Monzón, 2001).

Al examinar los efectos considerando los sustratos en relación al entomopatógeno *B. bassiana*, llama la atención que los sustratos que contenían fuente de glucosa fueron los de mayor producción de esporas y más aún, cuando éstas presentaban volumen, porosidad y mayor superficie de contacto, lo que permitió el mejor desarrollo de los mismos; los sustratos compuestos por arroz + caña de azúcar triturada; arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada; arroz + harina de maíz + azúcar presentaron estas características mencionadas, en este último tratamiento la harina de maíz + azúcar reemplazan a la caña de azúcar triturada.

La producción de esporas de *Beauveria bassiana* fue mayor en aquellos tratamientos que tuvieron un compuesto más que sólo el arroz y una fuente de glucosa (Amzct, Act, Amza, Amzm). Estos resultados concuerdan con los estudios de Cintra et al. (2001) quienes afirmaron que el uso de aditivos en medios de cultivo de arroz para la producción de *B. bassiana* aumenta la esporulación del mismo.

La mayor producción de esporas se presentó en el sustrato compuesto por arroz + caña de azúcar triturada promediando 16.50×10^6 esporas/ml. Este resultado no concuerda con los de Alvarenga et al. (1988) quienes citan una mayor producción para este hongo (10^9 esporas/ml). Entre tanto, Monzón (2001) menciona que, este rendimiento está determinado por la cepa y el estado de la misma y variando desde 5×10^6 hasta 2.5×10^{11} esporas/ml.

Crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en los diferentes tratamientos empleados.

La Figura 3 y la Tabla 3 presentan el crecimiento de *M. anisopliae* en los diferentes tratamientos. El hongo *M. anisopliae* ha demostrado, que los sustratos que presen-

taron respuesta preeminente en cuanto a esporulación fueron los compuestos por arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada; arroz + harina de maíz + azúcar y arroz + caña de azúcar triturada; también se verificó, que los compuestos por arroz + melaza; arroz + harina de maíz + melaza y arroz + azúcar se mantuvieron por debajo de la producción media más elevada

Todos los sustratos presentaron estadísticamente una mínima diferencia en cuanto a la incidencia de los mismos sobre la producción de esporas del mencionado hongo entomopatógeno.

Los sustratos compuestos por arroz + levadura + azúcar y arroz + levadura + melaza no presentaron diferencia significativa entre ambos, pero fueron los que presentaron la más baja producción de esporas del entomopatógeno.

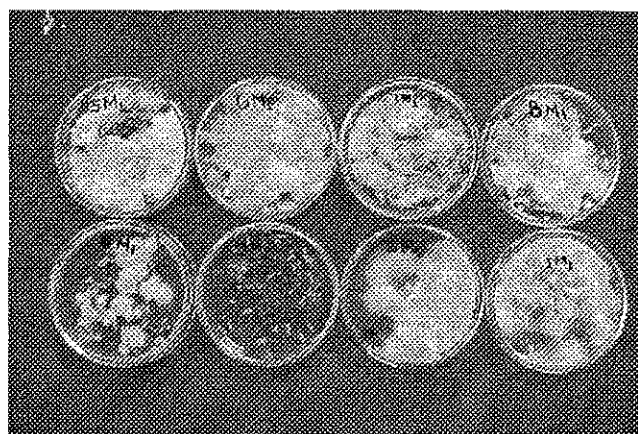


Figura 3. Crecimiento de *Metarhizium anisopliae* en los diferentes tratamientos utilizados. San Lorenzo, 2004.

Tabla 3. Promedio del número de esporas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en los diferentes sustratos. San Lorenzo, 2004.

Código sustratos	Composición de sustratos.	PNE (1)	TT (2)
Amzct	Arroz (33 g) + maíz (33 g) + C. azúcar tritur. (33 g)	45.77×10^6	a
Amza	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + azúcar (10 g)	42.13×10^6	a
Act	Arroz (50 g) + Caña de azúcar triturada (50 g)	36.68×10^6	a
Am	Arroz (100 g) + melaza (10 cc)	27.13×10^6	a
Amzm	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + melaza (10 cc)	26.93×10^6	a
Aa	Arroz (100 g) + azúcar (10 g)	26.73×10^6	a
Ala	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + azúcar (10 g)	4.28×10^6	b
Alm	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + melaza (10 cc)	2.50×10^6	b

C.V. (%): 15.9

(1) PNE: Promedio del número de esporas

(2) TT: Test de Tukey: En las columnas, medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el Test de Tukey al 5%.

Al analizar los resultados desde el punto de vista de la producción de esporas, *M. anisopliae* obtuvo una concentración media superior al de *B. bassiana*, el mismo obtuvo valores entre 45.77×10^6 y 26.73×10^6 esporas/ml (Tabla 3). Este resultado no concuerda con los obtenidos por Alvarenga et al. (1988) quienes citan mayor produc-

ción para este hongo (10^9 esporas/ml). Pero, Monzón (2001) menciona que este rendimiento está determinado por la cepa y el estado de la misma y varía desde 5×10^6 hasta 2.5×10^{11} esporas/ml.

El sustrato que permitió la mayor producción de esporas fue la compuesta por arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada correspondiente al tratamiento T_6 , la misma promedió una concentración de 45.77×10^6 esporas/ml. Esto está en concordancia con los estudios de Cintra et al. (2001) quienes afirmaron que el uso de aditivos en medios de cultivo de arroz para la producción de *M. anisopliae* aumenta la esporulación del mismo.

El testigo (Aa) así, como los sustratos Amza, Act, Am y Amzm no presentaron una diferencia estadísticamente significativa en contraste con el sustrato Amzct.

M. anisopliae produjo la menor cantidad de esporas en los sustratos compuestos por arroz + levadura + azúcar y arroz + levadura + melaza, los mismos llegaron a concentraciones de 4.28×10^6 esporas/ml y 2.50×10^6 esporas/ml diferenciándose significativamente de los tratamientos restantes. Como ocurrió con *B. bassiana*, existe la posibilidad de que la presencia de levadura cause la inhibición de la esporulación en *M. anisopliae*, considerando que los dos tratamientos cuyo sustrato estuvo compuesto de levadura produjo el menor número de esporas.

Crecimiento del hongo entomopatógeno *Paecilomyces sp.* en los diferentes tratamientos empleados.

La Figura 4 y la Tabla 4 representan el comportamiento de *Paecilomyces sp.* en los diferentes tratamientos. El resultado del análisis estadístico logró dilucidar las diferencias significativas existentes en cuanto a concentración de esporas producidas por *Paecilomyces sp.* en respuesta a los tratamientos utilizados.

La mejor respuesta en cuanto a la producción de esporas en los diferentes tratamientos fueron los compuestos por arroz + harina de maíz + azúcar; arroz + harina de maíz + melaza; arroz + melaza; arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada. Los mismos no difieren estadísticamente entre sí.

Los sustratos compuestos por arroz + azúcar y arroz + caña de azúcar triturada produjeron menor cantidad de esporas que los antes mencionados, pero más que los sustratos compuestos por arroz + levadura + melaza y arroz + levadura + azúcar, de quienes se diferencian estadísticamente (Tabla 4 y Figura 4).

El sustrato compuesto por arroz + levadura + azúcar es el sustrato que revela la menor incidencia sobre la esporulación de *Paecilomyces sp.* El mismo se diferencia estadísticamente de todos los restantes sustratos, excepto del compuesto por arroz + levadura + melaza.

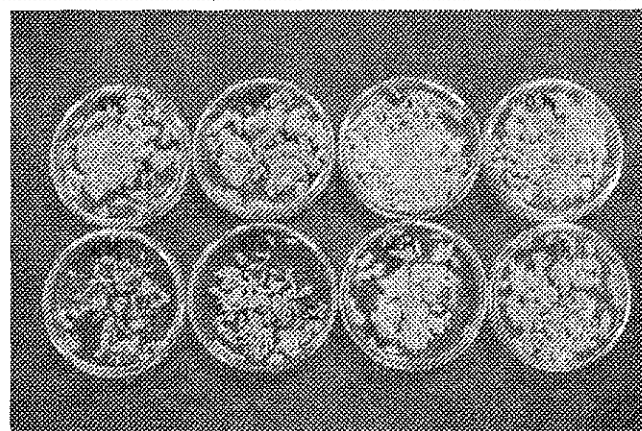


Figura 4. Crecimiento de *Paecilomyces sp.* en los diferentes tratamientos utilizados. San Lorenzo, 2004.

La concentración media de esporas en todos los sustratos tuvo una significativa diferencia, de tal forma que se agruparon en el siguiente parámetro. Los sustratos Amza, Amzm, Am y Amzct llegaron a producir esporas entre valores promedios de 666.70×10^6 a 569.33×10^6 esporas/ml. Mientras que los sustratos Act, Alm y Ala produjeron entre 373.30×10^6 y 58.67×10^6 esporas por ml. Sin embargo, los compuestos por Aa y Act se agruparon en el segundo lugar en cuanto a incidencia de la esporulación de este hongo.

Tabla 4. Promedio del número de esporas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces sp.* en los diferentes sustratos. San Lorenzo, 2004.

Código sustratos	Composición de sustratos.	PNE (1)	TT (2)
Amza	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + azúcar (10 g)	666.70×10^6	A
Amzm	Arroz (50 g) + maíz (50 g) + melaza (10 cc)	628.00×10^6	A
Am	Arroz (100 g) + melaza (10 cc)	600.00×10^6	A
Amzct	Arroz (33 g) + maíz (33 g) + C. azúcar tritur. (33g)	569.33×10^6	A
Aa (testigo)	Arroz (100 g) + azúcar (10 g)	564.00×10^6	ab
Act	Arroz (50 g) + Caña de azúcar triturada (50 g)	373.30×10^6	ab
Alm	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + melaza (10 cc)	89.33×10^6	bc
Ala	Arroz (100 g) + levadura (10 g) + azúcar (10 g)	58.67×10^6	c

C.V. (%): 10.1

(1) PNE: Promedio del número de esporas

(2) TT: Test de Tukey: En las columnas, medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el Test de Tukey al 5%.

El sustrato Aa (testigo) estadísticamente no se diferenció de los tratamientos de mayor producción como los Amza, Amzm, Am, Amzct; tampoco no presentó una diferencia significativa del sustrato Act.

Los sustratos Alm con 89.33×10^6 esporas/ml. y el sustrato Ala con 58.67×10^6 esporas/ml. fueron los sustratos donde se ha observado menor cantidad de esporas de *Paecilomyces sp.* El ensayo resalta que el sustrato Ala fue quien produjo la menor concentración de esporas para el hongo entomopatógeno en cuestión, alcanzando 58.67×10^6 esporas/ml. Del mismo modo como se mencionó en el estudio de los anteriores hongos entomopatógenos,

en los sustratos cuya composición se encontraba la levadura, se observó inhibición en la producción de esporas en *Paecilomyces* sp. lo que explica la menor producción.

La esporulación del hongo entomopatógeno *Paecilomyces* sp. fue superior en todos los sustratos, en contraste con los alcanzados por los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*. La mayor producción fue alcanzada por el sustrato Amza (666.70×10^6 esporas/ml), compuesto por arroz + harina de maíz + azúcar, similar a los obtenidos por Carr et al. (2003) quienes obtuvieron 6.7×10^8 esporas/ml utilizando como sustrato melaza + levadura torula.

En cuanto a los sustratos compuestos por arroz + levadura + melaza y arroz + levadura + azúcar, fueron los que presentaron las menores concentraciones de esporas (89.33×10^6 y 58.67×10^6), resultados que no coinciden por los encontrados por Carr et al. (2003).

Los entomopatógenos se reproducen principalmente sobre soporte sólido, principalmente cabecilla de arroz y otros soportes alternativos que se han ensayado con éxito, lo que permite adaptar su producción a las disponibilidades de la región donde se ubica el laboratorio (Carr et al., 2003).

En el país tanto la caña de azúcar, la harina de maíz y el arrozillo son considerados sustratos disponibles y con ciertas cualidades como ser el de proveer mejor superficie de contacto para el desarrollo de los hongos, por otro lado la de mas bajo costo es la caña de azúcar.

CONCLUSIÓN

- ◆ *Beauveria bassiana* produce elevada concentración de esporas (16.50×10^6 esporas/ml) en el medio de cultivo compuesto por arroz + caña de azúcar triturada.
- ◆ La menor concentración (1.25×10^6 esporas/ml) de *Beauveria bassiana* se produce en el sustrato compuesto por arroz + levadura + melaza.
- ◆ *Metarhizium anisopliae* alcanza la más elevada concentración (45.77×10^6 esporas/ml) sobre el sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + caña de azúcar picada.
- ◆ El sustrato compuesto por arroz + levadura + melaza es el que produce la menor concentración de esporas (2.5×10^6 esporas/ml) en *Metarhizium anisopliae*.
- ◆ El sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + azúcar es el que alcanza la mayor producción de esporas en *Paecilomyces* sp. (666.7×10^6 esporas/ml.).

- ◆ *Paecilomyces* sp. presenta su menor concentración de esporas (58.67×10^6 esporas/ml) sobre el sustrato compuesto por arroz + levadura + azúcar.
- ◆ Los sustratos cuya composición integra la levadura son las que producen la menor concentración de esporas/ml. en los tres hongos entomopatógenos evaluados.
- ◆ Los sustratos en cuya composición se presenta una fuente de glucosa son los que producen elevadas concentraciones de esporas en los tres hongos entomopatógenos evaluados.

LITERATURA CITADA

- ALEAN, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Bogotá, Colombia. Consultado 02 may 2004. Disponible en www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/tesis_irina_alean.pdf.
- ALVARENGA, A.; BASTOS, B.; OLIVEIRA, D.; SILVEIRA, P.; BULISANI, E. 1988. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. Arquivos Instituto Biológico (BR) – 55 (1/4): 31 – 35.
- ALVES, S. 1986. Controle microbiano de insetos. Sao Paulo Brasil: Editora Manole. 407 p.
- CARR, A.; ELÓSEGUI, O.; BEL PADRÓN, N. 2003. Reproducción de des cepas nativas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) BROWN & SMITH, sobre diferentes soportes líquidos y sólidos. Fitosanidad (CU)- 7(4): 7 – 11.
- CINTRA, E.; ALMEIDA, J.; BATISTA FILO, A. 2001. Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Sao Paulo, BR. Consultado 15 jan 2005. Disponible en www.biologico.sp.gov.br/arquivos/normas_portugues.
- FRENCH, E.; HEBERT, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, CR: 289 p.
- MONZÓN, A. 2001. Manejo integrado de plagas producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Managua, Nicaragua. Consultado 13 de may 2004. Disponible en www.web.catie.ac.cr/información/RMIP/rev63/pg95-103.pdf.