

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**“OPTIMIZACIÓN DE SUSTRATOS A BASE DE RESIDUOS  
ORGÁNICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS: *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium  
lecanii* y *Metarhizium anisopliae*”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:**

**CARLA ELENA DÍAZ FALCÓN**

**TARAPOTO – PERÚ**

**2015**

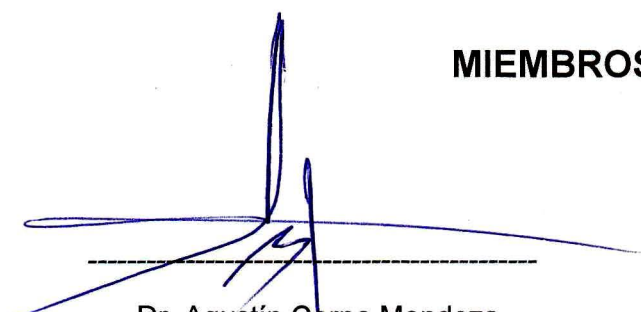
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL  
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS

“OPTIMIZACIÓN DE SUSTRATOS A BASE DE RESIDUOS  
ORGÁNICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS: *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium  
lecanii* y *Metarhizium anisopliae*”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO

MIEMBROS DEL JURADO



---

Dr. Agustín Cerna Mendoza  
**PRESIDENTE**




---

Ing. Eybis José Flores García  
**SECRETARIO**



---

Ing. M.Sc. Patricia Elena García Gonzáles  
**MIEMBRO**



---

Blgo. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz  
**ASESOR**

TARAPOTO – PERÚ

2015

## DEDICATORIA

A papá Dios y a mi amigo JESÚS quienes estuvieron conmigo siempre, pues me alimentaron de su amor cada día, siendo mi fortaleza en mis debilidades, me mostraron lo valiosa que soy y que puedo cumplir todos los sueños que tengo, a ellos las gracias inmensas.

A mis padres MIGUEL HERIBERTO DÍAZ PUERTA e IDA FALCÓN SABOYA quienes pusieron su confianza en mi persona, a mis hermanos LALY, MIGUEL y LARRY quienes son un instrumento por Dios para ser de bendición en mi vida. A todos ellos mi amor inmenso.

A mi familia en Cristo, por permitirme ser parte de un hogar maravilloso, mostrándome lo bello y fascinante que es la vida, siempre y cuando andemos por sendas de justicia. A todos mis amigos darles gracias por brindarme su amistad en todo tiempo.

## AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor Dr. Winston Franz Ríos Ruiz, docente de la Universidad Nacional de San Martín y al co-asesor Ingeniero José Jaime Cayotopa Torres del Instituto de Cultivos Tropicales por el asesoramiento de este trabajo de investigación, gracias por compartir sus conocimientos, tiempo, dedicación, paciencia y su amistad, para poder lograr este objetivo.
- Al Ingeniero Enrique Arévalo Gardini por brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en el Instituto de Cultivos Tropicales dentro del fondo nacional de ciencia y Tecnología FINCyT quién financió éste trabajo en el marco del proyecto “Optimización de Sustratos a base de residuos orgánicos para la Producción de Hongos Entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*.”
- A Dios quien estuvo conmigo en los buenos y malos tiempos, levantándome de mis torpezas, de mis malas decisiones, nunca me juzgo sino que me sostuvo, sé que puedo confiar en él siempre, a él unas eternas gracias.
- A mi familia por ser un instrumento por DIOS, pues estuvieron allí siempre y me dieron cuanto necesitaba, amor, comprensión y economía.
- A la Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ciencias Agrarias y todos los docentes quienes fueron parte de mi formación como profesional.
- A Delmar Cayotopa Olivera, un gran amigo y a todos los profesionales del área de Fitopatología, por brindarme las instrucciones necesarias dentro del laboratorio de la estación experimental “Juan Bernito”.
- Al Ingeniero Ginsberg Rodríguez del Castillo por el apoyo en la parte estadística, gracias por su tiempo, dedicación y enseñanza.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1: Ubicación geográfica del experimento.	24
2: Cepas de hongos entomopatógenos	27
3: Reactivación de cepas	29
4: Producción de inóculo de hongos entomopatógenos.	31
5: Preparación de sustratos orgánicos.	33
6: Preparación de sustancias enriquecedoras	33
7 Inoculación del hongo a los sustratos sólidos.	34
8: Hongos entomopatógenos en germinación	35
9: Colonización de hongos en sustratos sólidos	36
10: Producción de hongos entomopatógenos	37
11: Esporulación del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> .	37
12: Obtención de muestras para la evaluación de concentración de conidios.	38
13: Proceso de extracción de conidios de hongos entomopatógenos de sustratos y conteo en cámara Neubauer.	40
14: Porcentaje de germinación. A). extracción de la segunda dilución del hongo entomopatógeno	41
15: Número de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> en sustratos a base de residuos orgánicos	44
16: Número de conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> en sustratos orgánicos.	46

17:	Número de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> en sustratos orgánicos.	48
18	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> producidos en diversos sustratos orgánicos después de 18 horas de incubación.	50
19	Porcentaje de germinación de conidios <i>Lecanicillium lecanii</i> producidos en los diversos sustratos orgánicos a las 18 horas de haber sido incubado a plena oscuridad.	52
20	Porcentaje de germinación de conidios <i>Metarhizium anisopliae</i> producidas en los diversos sustratos orgánicos a las 18 horas de haber sido incubado a plena oscuridad.	54

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1: Descripción de los sustratos que fueron empleados para la producción de los hongos entomopatógenos <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
2: Insumos orgánicos usados para la producción de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> .	28
3: Volumen de agua empleada según tipo de sustrato.	32
4: Análisis de varianza para el número de conidios del hongo <i>Beauveria bassiana</i> .	43
5: Análisis de varianza para el número de conidios del hongo <i>Lecanicillium lecanii</i> .	45
6: Análisis de varianza para el número de conidios del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> .	47
7: Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios <i>Beauveria bassiana</i> .	49
8: Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios <i>Lecanicillium lecanii</i> .	51
9: Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios <i>Metarhizium anisopliae</i> .	53

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	OBJETIVOS.....	2
2.1	Objetivo general: .....	2
2.2	Objetivos específicos: .....	2
III.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
3.1	Control biológico (CB) .....	3
3.2	Hongos entomopatógenos (HEP) .....	4
3.3	Características de los principales hongos entomopatógenos. ....	7
3.4	Mecanismo de Acción de los hongos Entomopatógenos .....	10
3.5	Antecedentes de Producción de hongos entomopatógenos .....	15
3.6	Recuento directo de conidios .....	19
3.7	Cámara de Neubauer.....	20
3.8	Porcentaje de germinación o viabilidad.....	21
3.9	Composición nutricional .....	22
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
4.1	METODOLOGÍA .....	24
4.1.1	Ubicación del lugar experimental.....	24
4.1.2	Tratamientos.....	25
4.1.3	Material biológico.....	27
4.1.4	Material Orgánico .....	27
4.1.5	Producción de Hongos entomopatógenos.....	28
4.1.6	Variables evaluados .....	38
4.1.7	Diseño experimental .....	42
V.	RESULTADOS .....	43
5.1	Producción de conidios de hongos entomopatógenos en diversos sustratos orgánicos. ....	43
5.1.1	Producción de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> . ....	43
5.1.2	Producción de conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> . ....	45
5.1.3	Producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> . ....	47
5.2	Germinación de conidios de los hongos entomopatógenos. ....	49
5.2.1	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> .....	49
5.2.2	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	51
5.2.3	Porcentaje de germinación de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	53
VI.	DISCUSIONES .....	55



VII.	CONCLUSIONES.....	64
VIII.	RECOMENDACIONES .....	65
IX.	RESUMEN.....	66
X.	SUMMARY .....	67
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	68

## I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas sintéticos han sido el pilar de la lucha contra las plagas de insectos por más de 50 años. Sin embargo la resistencia a los insecticidas, el resurgimiento de plagas y el daño ambiental causado por éstos dan la pauta para la búsqueda de formas alternativas para combatir este problema, es así como nace el control biológico de plagas. El control biológico se considera como método básico en las estrategias del Manejo Integrado de Plagas (MIP) para el combate de plagas agrícolas, para ello se utilizan organismos entomopatógenos tales como virus, hongos, bacterias, nemátodos y protozoarios. El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas se ha incrementado a nivel global en las últimas décadas (Faria and Wraight, 2007), la producción de estos hongos se dan de manera exitosa en un sustrato específico como es el arroz entero de calidad con costo relativamente elevado; por lo que se requiere sustratos más económicos y eficientes.

En El Instituto de Cultivos Tropicales se realizó el presente trabajo de investigación con la finalidad de obtener nuevos sustratos para la producción de los Hongos Entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*, haciendo uso de cascarilla de arroz molida, cascarilla de arroz entera, aserrín, maíz molido, coronta de maíz molida, cáscara de maní molida y ñelen enriquecidos con levadura de cerveza, melaza de caña y carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>).

Por consiguiente, los resultados de este trabajo describen el gran potencial que tienen los diversos tratamientos; la cáscara de maní enriquecida con levadura de cerveza, melaza de caña y carbonato de calcio; fueron los sustratos más sobresalientes en la producción de conidios de *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae* respectivamente.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Optimizar el uso de sustratos a base de residuos orgánicos para la producción de hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio.

### 2.2 Objetivos específicos:

Determinar la eficiencia de sustratos a base de residuos orgánicos para la producción de conidios de *Beauveria bassiana*.

Determinar la eficiencia de sustratos a base de residuos orgánicos para la producción de conidios de *Lecanicillium lecanii*.

Determinar la eficiencia de sustratos a base de residuos orgánicos para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Control biológico (CB)

El factor que limita la producción de los cultivos son las plagas agrícolas. El uso indiscriminado de insecticidas sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, el resurgimiento de nuevas plagas y la contaminación ambiental (Angel-Cuapio, 2011). Como tal, comprende la aplicación armónica de diferentes métodos de control, como la lucha biológica y las prácticas culturales que requiere el cultivo, teniendo en cuenta los niveles poblacionales de las plagas y enfermedades a controlar, la presencia de los bio-reguladores naturales, las etapas fenológicas del cultivo y las condiciones ambientales presentes (Alatorre-Rosas, 2006).

Entre los organismos más utilizados como agentes de control se incluyen virus, bacterias y sus toxinas, hongos y otros microorganismos patógenos. Estos microorganismos generalmente tienen como efecto la muerte directa de la especie de insecto que atacan o actúan como antagonistas inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos mediante sustancias que excretan. Aproximadamente el 80% de las enfermedades que se producen en los insectos tienen como agente causal un hongo (Badii, 2006).

El uso de hongos entomopatógenos (HEP) para el control de tales insectos constituye, por lo tanto un componente importante, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan para este propósito. Los hongos como *Beauveria* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*,

*Paecilomyces* sp., son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospederos y se han utilizado para controlar diversas plagas en diferentes lugares (Angel-Cuapio, 2011).

### **3.2 Hongos entomopatógenos (HEP)**

Los entomopatógenos son microorganismos capaces de infectar y desarrollar una enfermedad en un insecto huésped al cual terminan matando (ICA, 2005). En diferentes países se utilizan como agentes de control biológico, una alternativa viable para regular los insectos fitófagos que afectan cultivos de importancia económica dentro de un programa de manejo de plagas (Alatorre-Rosas, 2006).

La mayoría de los bioplaguicidas elaborados con base en HEP comercialmente disponibles en el mercado incluyen cepas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp.; estas especies producen una cantidad considerablemente grande de conidios (esporas asexuales) que son responsables de la infección y se dispersan en el medio ambiente debido a las corrientes del viento, o bien por el mismo insecto que se encuentre infectado al entrar en contacto con uno sano. Cuando los conidios están sobre la cutícula de un huésped, se fijan y germinan, iniciando una serie de cascadas de reacciones de reconocimiento y activación de enzimas, tanto por el huésped como por el hongo (Angel-Cuapio, 2011). La enfermedad producida por hongos se llama micosis (Elizalde-Blancas, 2006).

Los HEP pueden ocasionar enfermedad y propagarse en la población de artrópodos, dependiendo de las interacciones y factores relacionados con: el patógeno (patogenicidad, virulencia, dispersión y persistencia), el hospedero (susceptibilidad, densidad, distribución y comportamiento) y el medio ambiente (abióticos: temperatura, humedad, viento, lluvias y bióticos: parásitos, depredadores, planta - huésped) (Córdova, 2010). Entre los géneros de HEP se destacan: *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Córdova, 2010).

Específicamente los hongos del género *Metarhizium* y *Beauveria*, han sido utilizados exitosamente en el control de algunos insectos sociales (Mena Córdova, 2010), que se encuentra distribuidos con amplitud en la naturaleza en las diversas zonas climáticas (Urtubia *et al*, 2007). Los hongos como *Beauveria spp.*, *Metarizium aisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces spp.*, son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospedantes y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares (Cañedo y Ames, 2004).

Estos géneros pertenecen a la división Eumycota y a la subdivisión Deuteromycotina, también llamados hongos imperfectos porque aparentemente no se conoce su fase sexual y se reproducen por conidios (esporas asexuales), todas éstas especies presentan micelio septado y ramificado y los conidios son producidos por fialidas. Se conocen alrededor de 100 especies con efecto insecticida, sin embargo, solamente cerca de 20 especies han sido estudiadas como agentes de control (Carballo *et al*, 2004).

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control, ya que constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos. Estos hongos inician su proceso infectivo sobre sus hospedantes en las siguientes fases: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. La unidad infectiva está constituido por conidios (Castro, 2013).

Cañedo y Ames (2004), mencionan que las principales ventajas de estos hongos son:

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de las cepas, pueden ser específicas a nivel de especie, sin afectar a los enemigos naturales.
2. Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
3. Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros.
5. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto.

Cañedo y Ames (2004); mencionan algunas desventajas, como:

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites antidesecantes).
2. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
3. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente.  
  
Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

### **3.3 Características de los principales hongos entomopatógenos.**

Los hongos entomopatógenos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidios y desarrollo miceliar, lo cual permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo como lo describe Carreño (2003).

#### **3.3.1 *Beauveria bassiana***

Este hongo ha sido aislado de más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de cultivos de importancia económica.



La fructificación está constituida por células conidiógenas que forman conidios sucesivas en un raquis que se desarrolla en forma de zigzag. Ésta fructificación ocurre como synmema o conjunto de células conidiógenas unidas (Gómez, *et al*; 2011).

En nuestro país esta especie de hongo se utiliza para el control de plagas como la “broca de café” (*Hypothenemus hampei*), “gorgojo negro de plátano” (*cosmopolites sordidus*), “palomitas de la col (*Plutella xylostella*, *Hellula undella*), pulgones, arañitas rojas. Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo (Gómez, *et al*; 2011).

Estos hongos presentan colonias blancas que se vuelven crema, amarillo pálidas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas, en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) O Agar Extracto de Malta (MEA) presentan aspecto aterciopelado a polvoriento (Gómez, *et al*; 2011).

### **3.3.2 *Lecanicillium lecanii***

Presenta micelio tabicado, conidióforos simples o verticilados, más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos, en donde se encuentran los conidios agrupados en cabezuelas, rodeados de una sustancia mucilaginosa, unicelulares, hialinos, forma cilíndricos a ovoides. Este hongo cubre con un micelio de color blanco a sus hospederos, rodeándolo como con un halo, de allí que se le conoce con el nombre de “hongo blanco de la corona” (Gómez, *et al*; 2011).

En nuestro país este hongo se utiliza para controlar “moscas blancas”, *Bemisia tabaco*, *Paraleyrodes citri*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aleurodicucs cocois*, pulgones y arañas rojas. (Gómez, *et al*; 2011).

Las características que presenta este hongo son colonias blancas o cremas, algodonosas delicadas, incoloras al reverso, amarillo pálido o amarillo oscuro a los 10 días a 25 ° C en Agar-Estracto de Malta (MEA) o en Papa Dextrosa Agar (PDA) (Gómez, *et al*; 2011).

### **3.3.3 *Metarhizium anisopliae***

Es uno de los hongos entomopatógenos más conocidos, siendo la primera especie que se evaluó en condiciones de campo para el control de un insecto fitófago. Este hongo presenta un alto potencial para controlar plagas en todos los agroecosistemas del mundo. Son activos contra una gran diversidad de insectos en diferentes órdenes y familias, debido a su carácter cosmopolita y su gran diversidad genética, además de ser un agente seguro, con mínimos riesgos para el hombre, los vertebrados y el medio ambiente, tiene una alta persistencia cuando es aplicado al suelo. (Barajas *et al.*, 2010).

Presentan conidióforo ramificado, conidios cilíndricos a ovales que se forman en cadenas originales en fiálides. Los conidios son producidos en sucesión basipétala, estando la colonia más joven en la base de la cadena. Los conidios son blancos cuando son jóvenes, pero conforme maduran toman el color verde oscuro característico de esta especie (Gómez, *et al*; 2011).

Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (Carballo, *et al.*; 2004).

En nuestro país este hongo se utiliza para el control de algunos insectos plaga como “gusanos blancos” o “chacareros”, palomillas de la col (*Plutella xylostella*, *Hellula undella*) (Gómez, *et al.*; 2011). Una de las principales características de este hongo es que presenta colonias de color verde que varían desde el oliváceo hasta amarillo-verde o verde oscuro. Desarrollan bien a 20 °C en Papa Dextrosa Agar (PDA) (Gómez, *et al.*; 2011).

### **3.4 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos**

De modo general, el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos sobre los insectos se desarrolla en varias fases que son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. La unidad infectiva son las estructuras de reproducción sexual o asexual, es decir las esporas o los conidios (García, 2012).

El proceso inicia cuando el conidio se adhiere a la cutícula del insecto; luego se produce un tubo germinativo y un apresorio; con éste el hongo se fija a la cutícula y con el tubo germinativo (hifa de penetración) penetra al interior de las distintas capas de la cutícula del insecto; en la que interviene un mecanismo físico - químico, el primero consiste en la presión ejercida por la hifa, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Pucheta *et al.*, 2006); los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas

externas; iniciando una serie de reacciones de reconocimiento y activación de enzimas, tanto por el huésped como por el hongo; por otra parte, las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. (Cañedo y Ames, 2004; Montesinos-Matías, 2011).

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizándolo completamente en forma de blastosporas en la hemolinfa, y a partir de la cual se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo (García *et al.*, 2008).

Al agotarse los nutrientes dentro del insecto, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo los órganos del hospedero; finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de conidios, con lo que se puede completar el ciclo infeccioso (Pucheta *et al.*, 2006).

Gómez *et al.*, 2011. Menciona que no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los hongos entomopatógenos y los insectos. En general la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados infectan al hospedante a través de la cutícula. El contacto entre la unidad infectiva del entomopatógeno y el insecto es indispensable para el inicio del proceso infeccioso.

#### **3.4.1 Adhesión del conidio a la cutícula del insecto.**

Es el contacto de la unidad infectiva del hongo o conidio con la superficie del insecto. Las responsables de esta unión son las características físicas y químicas de las superficies tanto del conidio como de la superficie del insecto. En algunos hongos la adhesión es un proceso no específico, mientras que en otros es un proceso específico para los conidios. Las zonas de adhesión, son las regiones intersegmentales o zonas blandas. (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.2 Germinación de los conidios**

Es el proceso mediante el cual el conidio y/o espora sobre el integumento del insecto, germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio con el cual se fija en la cutícula. El tubo germinativo puede ser largo o corto y algunos casos no llega a formarse. El tiempo de germinación dependiendo de la cepa es de 12 a 20 horas (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.3 Penetración del integumento**

La penetración de la cutícula del insecto, ocurre como resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. En este proceso participa un mecanismo físico y otro químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas las cuales degradan los tejidos de la zona de penetración, la que facilita la penetración física. El tiempo de la penetración es de 8 a 12 horas (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.4 Multiplicación del hongo en el hemocele**

Una vez que el hongo llega al hemocele, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, en forma de levaduras o desarrollo por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.5 Producción de toxinas**

Los hongos producen toxinas que matan al insecto, aunque algunos hongos aparentemente no poseen toxinas y matan al insecto al consumir todos sus nutrientes. Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicos para artrópodos, causando la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, produciendo la degeneración de los tejidos producto de la pérdida de su integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida del fluido, además actúan como inhibidores de las reacciones de defensa del insecto. Las toxinas producidas pueden ser enzimas las cuales pueden ser secretadas en cantidades significativas tanto por el cuerpo del insecto como en los medios de cultivo (lipasas, licogenasa, amilasas y quitinasas), o metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pudiendo ser afectada por diferentes factores como nutrientes, pH, temperatura, etc. (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.6 Muerte del insecto**

La muerte del insecto infectado, ocurre generalmente antes de que el hongo colonice totalmente el hemocele del insecto, debido a gran parte a la acción de

las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la parte parasítica y se inicia la fase saprofítica. El tiempo de la muerte depende de la cepa del hongo del hospedante y de las condiciones ambientales (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.7 Colonización**

Una vez muerto el insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos. Después de la colonización, en la mayoría de los casos los hongos producen sustancias antibacteriales que impiden la descomposición del insecto manteniéndolo como una momia, también puede presentarse el cambio de color en el cadáver del insecto. El tiempo que dura la colonización es de 3 a 8 días, dependiendo de la cepa del hongo (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.8 Emergencia**

Después de la muerte del insecto, si las condiciones de humedad relativa ambiental son favorables, ( $\geq$  a 90 %) el hongo emerge al exterior a través de la cutícula principalmente a través de las zonas menos esclerosadas, y esporulan sobre el cadáver produciendo inóculo para infectar a otros insectos. Si las condiciones externas no son favorables, el hongo permanece en el interior del insecto, protegido por el integumento, donde puede sobrevivir por algunos meses, hasta que lleguen las condiciones favorables para su esporulación (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.9 Esporulación**

Cuando las hifas emergen al exterior y si las condiciones de humedad relativa son favorables, ocurre la producción de conidios o esporas en un periodo de 24

a 48 horas. En esta fase el insecto muerto adquiere la coloración característica del hongo involucrado (Gómez, *et al*; 2011).

#### **3.4.10 Diseminación**

Las conidias o esporas del hongo que son las unidades infectivas se diseminan por medio del viento, lluvia, animales, hombre, buscando nuevos hospedantes para iniciar el proceso de infección. La dispersión puede ser un proceso activo o pasivo, dependiendo de las características de la colonia y del esporangio (Gómez, *et al*; 2011).

### **3.5 Antecedentes de producción de hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial para ser empleados como biocontroladores (Cañedo y Ames, 2004). Son tratados de forma industrial, es decir, que se cultivan, formulan, empaquetan, almacenan y se comercializan como un insecticida convencional. (Badii, 2006; Giraldo, 2009). Por ejemplo, los géneros *Beauveria sp*, *Metarhizium sp* tienen un amplio uso y aceptación por su especificidad y efectividad como insecticidas biológicos (Cañedo y Ames, 2004; Morales y col., 2009; García y González, 2010). Se suelen comercializar en preparados a base de esporas (Giraldo, 2009).

Se han reportado diferentes trabajos de investigación que conllevan a la mejoría en el rendimiento y esporulación de hongos entomopatógenos. Se estudiaron en diferentes sustratos orgánicos y sintéticos aunque no solo depende del aislado sino del tipo de medio de cultivo (Cuapio, 2011).



De acuerdo con Cañedo y Ames, (2004); Rodríguez y Arredondo, (2007) y St Leger, (2007) las condiciones de humedad y temperatura ambiental son factores que inciden proporcionalmente en la germinación y proliferación de los HEP.

Gómez, *et al*; (2011) menciona que la utilización de productos a base de hongos entomopatógenos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos biológicos de alta eficiencia en la reducción de las plagas para las cuales se están utilizando. Para la obtención de estos productos biológicos se requiere producir estos hongos entomopatógenos, el cual consiste en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (conidios) en un sustrato natural como: arroz, trigo, cebada, maíz, frijol y soya, siendo los más utilizados el arroz y el trigo.

En otros trabajos de investigación se han probado arroz limpio, trigo, cebada, maíz partido, cascarilla de cereales, pasto seco picado, entre otros (Cañedo y Ames, 2004).

Sandoval-Coronado *et al.*, (2011) en su trabajo de investigación “Producción en cultivo sólido de *Metarhizium anisopliae* en grano de arroz cocido a diferentes concentraciones de agua”, usó arroz Sinaloa adquirido a forma de granel y triturado a través de un molino para obtener partículas más pequeñas, los mejores resultados los encontró de forma variada entre los tratamientos arroz triturado + 10 ml de agua destilada ( $3,5 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato), arroz entero + 30 ml de agua destilada ( $3,4 \times 10^9$   $5 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato) y

arroz entero + 40 ml agua destilada ( $3.8 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato). El porcentaje de germinación de las esporas producidas oscilaron entre 81.4 y 98.34 correspondieron a los tratamientos arroz triturado + 10 ml de agua destilada y arroz entero + 30 ml de agua destilada, respectivamente. Los porcentajes por lo general se presentaron con buena viabilidad por arriba del 90%.

Grabowski (2005), en su investigación sobre: “Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Paecilomyces sp.*” comparó la eficiencia de la esporulación de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a base de sustratos de 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. Los resultados obtenidos demostraron que *Beauveria bassiana* produce elevada concentración de esporas ( $16,50 \times 10^6$  esporas  $ml^{-1}$ ) en el sustrato compuesto por arroz + caña de azúcar triturada. *Metarhizium anisopliae* alcanzó la más elevada concentración ( $45,77 \times 10^6$  esporas  $ml^{-1}$ ) sobre el sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada.

Gómez *et al.* (2011), nos menciona que concentraciones de conidios mayores o igual a  $1 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato están siendo aptas para ser utilizadas en campo.

Tlecutil (2010), nos menciona en el trabajo de investigación “Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos con concentraciones modificadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Se observó que el mejor sustrato para la producción de conidios fue la avena adicionada con peptona y que a concentraciones altas de oxígeno, se obtienen mejores rendimientos de conidios, con (4.25 X 10<sup>7</sup> conidios g<sup>-1</sup> de sustrato).

En estudios similares, Prakash *et al.* (2008), evaluaron distintos sustratos como el arroz, cebada y sorgo sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, observando que el mejor sustrato fue el arroz.

La producción de conidios en distintas especies de hongos entomopatógenos se ve afectado por diversos factores, entre ellos los nutricionales (Tlecutil, 2010). (Shah *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2006). Consideran que los factores nutricionales durante el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* afectan la germinación de los conidios. Ibrahim *et al.*, (2002); reportan que los medios ricos en nutrientes, como agar extracto de levadura permitieron una mayor germinación de los conidios de *M. anisopliae*.

Cortez-Madrigal (2007), en el trabajo de investigación producción de *Lecanicillium lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad, nos menciona que los sustratos con mayor producción de conidios fueron bagazo de caña y arroz (839,7 ± 1,2 x 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup>), sorgo y olote (825,8 ± 1,7 x 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup>). Aunque el pulido fue el medio menos eficiente, la producción conidial en todas sus

combinaciones fue superior a la del arroz solo, que mostró la menor producción conidial ( $265,4 \pm 1 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ ).

Monzón (2001), menciona que el rendimiento de conidios está determinado por la cepa y el estado de la misma y varía desde  $5 \times 10^9$  hasta  $2,5 \times 10^{11}$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ .

Los estudios de Cintra *et al.*, (2001), afirmaron que el uso de aditivos en medios de cultivo de arroz para la producción de *Metarhizium anisopliae* aumenta la esporulación del mismo.

### **3.6 Recuento directo de conidios**

Gómez *et al.*, (2011), determinó la cantidad de conidios típicos del hongo entomopatógeno presente en 1 g del producto final de la siguiente manera: de cada 10 bolsas preparadas, se toma una bolsa al azar y se lleva a la cámara de flujo laminar, se abre y se toma 1 g, el cual se pone en una bolsa estéril conteniendo 10 ml de Tween al 0,1%, en este caso la suspensión corresponde a  $10^{-0}$ , se agita bien para mezclar durante 1 minuto.

Este mismo procedimiento se realiza también en un tubo de prueba que contiene 10 ml de Tween al 0,1% agitando en un vórtex por 1 minuto. Luego se realiza la dilución  $10^{-1}$  tomando 1ml de la bolsa o del tubo y se le adiciona a un tubo de prueba que contiene 9 ml de Tween al 0,1% y así sucesivamente hasta conseguir la dilución  $10^{-2}$ . Es aconsejable que por cada dilución que se haga,

el tubo de la dilución correspondiente se agite durante 30 segundos en un vórtex.

Con una pipeta Pasteur, se toma una muestra de la última dilución y se llena la cámara de Neubauer por capilaridad, luego es llevada al microscopio, donde se procedió a contar los conidios en el cuadrante central y en el cuadrante de las cuatro esquinas de la cámara, de esta manera se determinó la concentración de conidios por ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ conidios g}^{-1} = \bar{X} * 5 * 10^4 * \text{ID}$$

**5** = N° cuadraditos contados en el cuadrante central

$\bar{X}$  = Promedio de conidios contados

**ID** = Inversa de la dilución empleada

Para obtener el número de conidios por gramo del producto, se multiplicó el promedio del número de conidios por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión  $10^{-0}$  y se dividió por el peso de la muestra utilizada.

Si el producto tiene una concentración de (conidios  $\text{g}^{-1}$ )  $\geq 10^9$ , estará apto para ser utilizado en campo Gómez *et al.*, (2011).

### 3.7 Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de

un diamante una cuadrícula, correspondiente a un cuadrado 3 X 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm.

Así el área sombreada marcada **L** corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0,1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie **L** y el cubre objeto es de 0,1 milímetro cúbico, es decir 0,1 microlitro que es igual a 0,0001 cm<sup>3</sup>. El conteo de conidios se realiza en el cuadrante medio central, contando cinco cuadraditos, los 4 de las esquinas y el centro.

En cada cuadradito del cuadrante medio central se cuentan todos los conidios que se encuentren dentro y en las líneas de borde superior e izquierda del cuadradito, no se cuentan los conidios que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha. Gómez *et al.*, (2011).

### **3.8 Porcentaje de germinación o viabilidad**

Con esta prueba se determina el porcentaje de conidios típicos del hongo que está en condiciones de germinar en un periodo de tiempo determinado.

Fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} * 100$$

a = número de conidios germinadas

b= número de conidios sin germinar

Gómez *et al.* (2011), menciona que si el resultado es igual o superior al 90 % se considerará que la viabilidad del producto es satisfactorio

### **3.9 Composición nutricional**

#### **Levadura de cerveza**

La levadura de cerveza se compone de microorganismos muy activos, con una gran capacidad de reproducción. Durante este proceso, se generan prácticamente todas las vitaminas y proteínas vegetales de gran valor biológico, enriquecedoras con oligoelementos y minerales. Las levaduras tienen un elevado contenido en proteína (46%) de alta digestibilidad, así como un adecuado perfil de aminoácidos esenciales (especialmente lisina y treonina), por lo que constituye una buena fuente proteica (Naturesan, 2014)

La levadura es una fuente de distintos nutrientes que tienen un valor nutritivo por sí mismos, además son fuentes alternativas a la proteína de origen animal. Posee proteínas de valor biológico alto con buena composición en aminoácidos. Contiene mayor cantidad de lisina que la soja y los guisantes y es dos veces más rica que las proteínas contenidas en las semillas de oleaginosas. Peralta (2008).

### **Melaza de caña**

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales, proteína 3% y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de la caña localizado. Fajardo (2007).

Por lo general tienen una composición compleja de constituyentes algunos propios del material original y otros aparecidos como productos de reacción: diversos azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructuosa y un gran número de compuestos, orgánicos e inorgánicos: aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, gomas y sustancias cromóforas derivadas del furfural y de reacciones de encafecimiento no enzimático, caramelización, etc. Tellez, (2004).

### **Carbonato de calcio**

El carbonato de calcio, es una enmienda muy utilizada para neutralizar la acidez del suelo y suministrar calcio (Ca) para la nutrición de las plantas; además se utiliza para mejorar los rendimientos de todo tipo de alimento para animales, pues contiene fuente primaria de calcio (Ipni, 2014).



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 METODOLOGÍA

#### 4.1.1 Ubicación del lugar experimental

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la Estación Experimental Juan Bernito, Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Cultivos Tropicales (ICT).

#### Ubicación Política

Departamento : San Martín

Provincia : San Martín

Distrito : La Banda de Shilcayo

#### Ubicación Geográfica

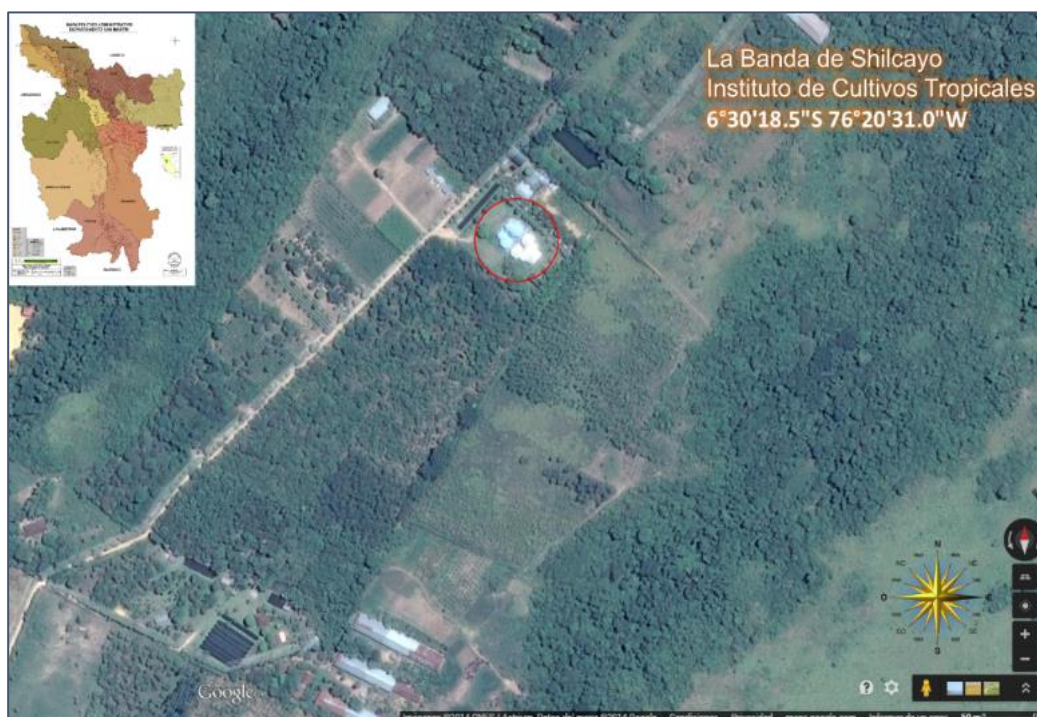


Figura 1. Ubicación geográfica del Experimento.

Fuente: Google earth, 2014.

Latitud Oeste : 76° 00' 18"  
Latitud Sur : 06° 00' 28"  
Altitud : 315 m.s.n.m.m

#### **4.1.2 Tratamientos**

El experimento se constituyó de tres ensayos, donde se evaluó tres hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*) con 23 tratamientos y tres repeticiones para cada uno, totalizando 207 unidades experimentales. Los tratamientos fueron determinados basándose en las diferentes proporciones de los insumos orgánicos empleados y como testigo fue considerado el sustrato arroz. En el siguiente cuadro se detallan los tratamientos.

**Cuadro 1:** Descripción de los sustratos que fueron empleados para la producción de los entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*

Tto.	PROPORCIÓN DE LOS SUSTRATOS
T0	Arroz entero (80 g)
T1	Cascarilla de arroz molida (50 g)+ Ñelen (30 g)
T2	Aserrín (50 g)+ Ñelen (30 g)
T3	Maíz amarillo molido (50 g) + Ñelen (30 g)
T4	Coronta de maíz molido (50 g) + Ñelen (30 g)
T5	Cáscara de maní molida (50 g)+ Ñelen (30 g)
T6	Cascarilla de arroz molida (50 g)+ Ñelen (30 g) + CaCO <sub>3</sub>
T7	Aserrín (50 g)+ Ñelen (30 g) + CaCO <sub>3</sub>
T8	Maíz amarillo molido (50 g)+ Ñelen (30 g) + CaCO <sub>3</sub>
T9	Coronta de maíz molido (50 g) + Ñelen (30 g) + CaCO <sub>3</sub>
T10	Cáscara de maní molida (50 g)+ Ñelen (30 g) + CaCO <sub>3</sub>
T11	Cascarilla de arroz molida (50 g)+ Ñelen (30 g) + Levadura de cerveza
T12	Aserrín (50 g)+ Ñelen (30 g) + Levadura de cerveza
T13	Maíz amarillo molido (50 g) + Ñelen (30 g) + Levadura de cerveza
T14	Coronta de maíz molido (50 g)+ Ñelen (30 g) + Levadura de cerveza
T15	Cáscara de maní molida(50 g) + Ñelen (30 g) + Levadura de cerveza
T16	Cascarilla de arroz molida (50 g)+ Ñelen (30 g) + Melaza de caña
T17	Aserrín (50 g)+ Ñelen (30 g) + Melaza de caña
T18	Maíz amarillo molido (50 g) + Ñelen (30 g) + Melaza de caña
T19	Coronta de maíz molido (50 g)+ Ñelen (30 g) + Melaza de caña
T20	Cáscara de maní molida (50 g) + Ñelen (30 g) + Melaza de caña
T21	Cascarilla de arroz entero (50g) + Ñelen (30g) + agua
T22	Ñelen (150 g)

### 4.1.3 Material biológico

Los hongos entomopatógenos estudiados fueron: *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*, derivados de cepas comerciales del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), institución que mantiene un cepario de conservación (figura 2).



**Figura 2.** Cepas de hongos entomopatógenos, A) *Beauveria bassiana*, B) *Lecanicillium lecanii*, C) *Metarhizium anisopliae*.

### 4.1.4 Material Orgánico

Para la evaluación de la producción de conidios de los hongos entomopatógenos, se utilizó material orgánico tales como: arroz entero pulido, ñelén (arroz chancado), cascarilla de arroz entero y molida (*Oryza sativa*), aserrín compuesto de huairuro y papelillo, maíz amarillo molido (*Zea mays*), coronta de maíz molido y cáscara de maní molida (*Arachis hypogaea*), provenientes de los cultivos de la región de San Martín (cuadro 2).

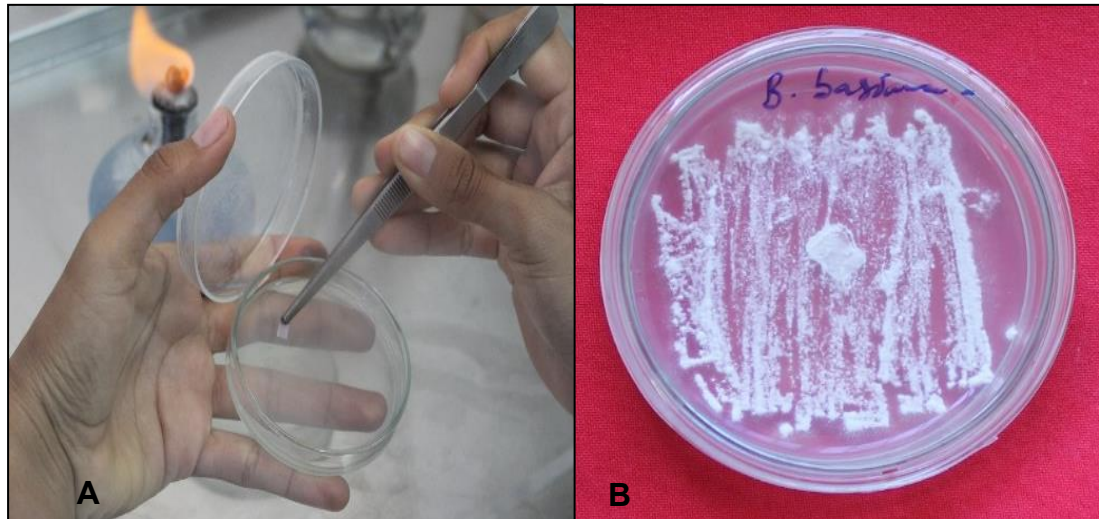
**Cuadro 2:** Insumos orgánicos usados para la producción de *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*.

Insumos	Nombre científico	Procedencia	variedad
Arroz pulido, ñelén,	<i>Oryza sativa</i>	Mercado local	INIA 509 "Esperanza"
Cascarilla de arroz entero y molida	<i>Oryza sativa</i>	Molino "El consentido"	INIA 509 "Esperanza"
Aserrín	- <i>Ormosia coccinea jacks</i> - <i>Bursera odorata</i>	Carpintería "La florentina"	-Huairuro 50% -papelillo 50 %
Maíz amarillo molido	<i>Zea mays</i>	Mercado local	Marginal 28 Tropical
Coronta de maíz molido	<i>Zea mays</i>	Mercado local	Marginal 28 Tropical
Cáscara de maní molida	<i>Arachis hypogaea</i>	Mercado local	

#### 4.1.5 Producción de hongos entomopatógenos.

##### Reactivación de cepas de hongos.

Para el inicio del proceso de producción de hongos entomopatógenos se reactivaron las cepas con la finalidad de incrementar inóculo en medio líquido, el proceso fue el siguiente: Se dispensó medio de cultivo agar papa sacarosa más cloranfenicol (PSA+ C) en placas Petri; con una pinza se extrajo un papel con el hongo (figura 3 A) del cono de conservación con sílica gel y se colocó en el centro de la placa, se agregó tres gotas de agua destilada estéril (ADE) para hidratar el papelito por 2 minutos y luego con la pinza se arrastró por toda la superficie de la placa, finalmente se selló la placa y se dejó en incubación a 27°C durante 7 días aproximadamente hasta lograr la colonización y esporulación en toda la placa (Figura 3 B).



**Figura 3.** Reactivación de cepas. A) Reaislamiento de *Beauveria bassiana*, B) Hongo desarrollado en PSA a los 8 días.

### **Incremento de inóculo de hongos en medio líquido.**

Una vez que las cepas de los hongos se desarrollaron en placas de Petri con medio de cultivo sólido, estas fueron sembradas en medios de cultivo líquidos con la finalidad de incrementar el inóculo para la producción en sustratos orgánicos sólidos. A continuación se describe la metodología usada para la elaboración de los medios líquidos.

### **Caldo Papa Dextrosa (PD) para incremento de inóculo de *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*.**

En un vaso de precipitación de 500 ml se calentó a 50°C 200 ml de agua destilada, se agregó 5 g de puré de papa, se homogenizó y se agregó 18 g de dextrosa, luego con una bagueta se agitó la mezcla y se enrazó hasta obtener 1 l de papa dextrosa luego fueron dispensados en matraces y autoclavados a 121°C y 15 lb de presión por 20 minutos.

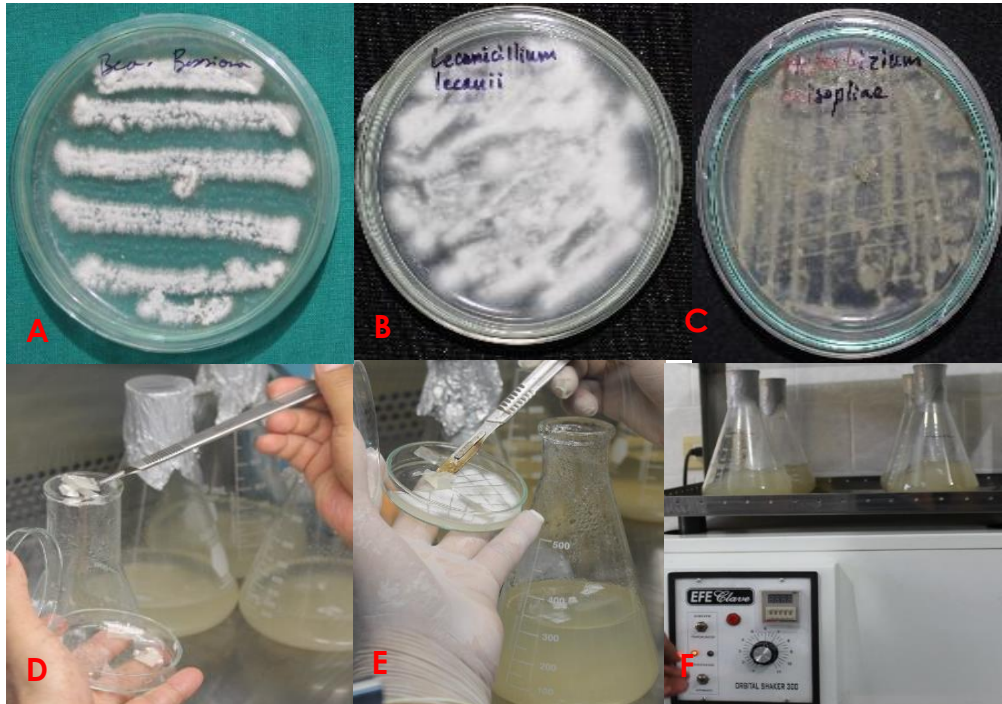
### **Caldo de Papa Dextrosa + Levadura (PDL) para *Metarhizium anisopliae*.**

Para la preparación de PDL se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la elaboración de PD, con la diferencia que se aumentó 20 g de levadura de cerveza, obteniendo 1 l de caldo; seguido se dispensó en matraces para su respectiva esterilización a través de la autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 20 minutos.

### **Inoculación e incubación de los hongos entomopatógenos en medio líquido.**

Una vez frío los medios líquidos fueron llevados a la cámara de flujo laminar (CSFL). A cada matraz que contenía un litro de medio de cultivo se agregó 0,1 g de cloranfenicol, éstos fueron expuestos a rayos UV por 10 minutos; posteriormente las placas que contenían los hongos esporulados, fueron divididas con un bisturí en segmentos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y luego incorporados al medio líquido (figura 4A); finalmente los matraces fueron sellados herméticamente con papel aluminio y parafilm para el proceso de incubación en Shaker a 140 RPM a temperatura ambiente  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ .





**Figura N° 04.** Producción de inóculo de hongos entomopatógenos. A). *B. bassiana* B). *L. lecanii* C). *M. anisopliae* D y E ). Inoculación de hongos y F). Incubación en Shaker.

### Preparación de sustratos sólidos y sustancias nutritivas

Algunos insumos orgánicos como cáscara de maní, cascarilla de arroz y coronta de maíz fueron triturados hasta obtener partículas pequeñas entre 0.1mm a 1 cm; los sustratos fueron pesados en una balanza de precisión y luego empacados en bolsas de polipropileno de 11 x 16 pg x 2 micras (figura 5). Posteriormente se preparó sustancias nutritivas como: melaza de caña, levadura de cerveza y carbonato de calcio, a razón de 30, 8 y 4,5 g<sup>-1</sup> l respectivamente (figura 6) y se adicionaron a los sustratos.

La cantidad utilizada para los diferentes sustratos fue determinada mediante ensayos previos de desarrollo de los hongos entomopatógenos, cabe mencionar que el volumen empleado para cada sustrato fue variable debido a las características particulares de cada sustrato.



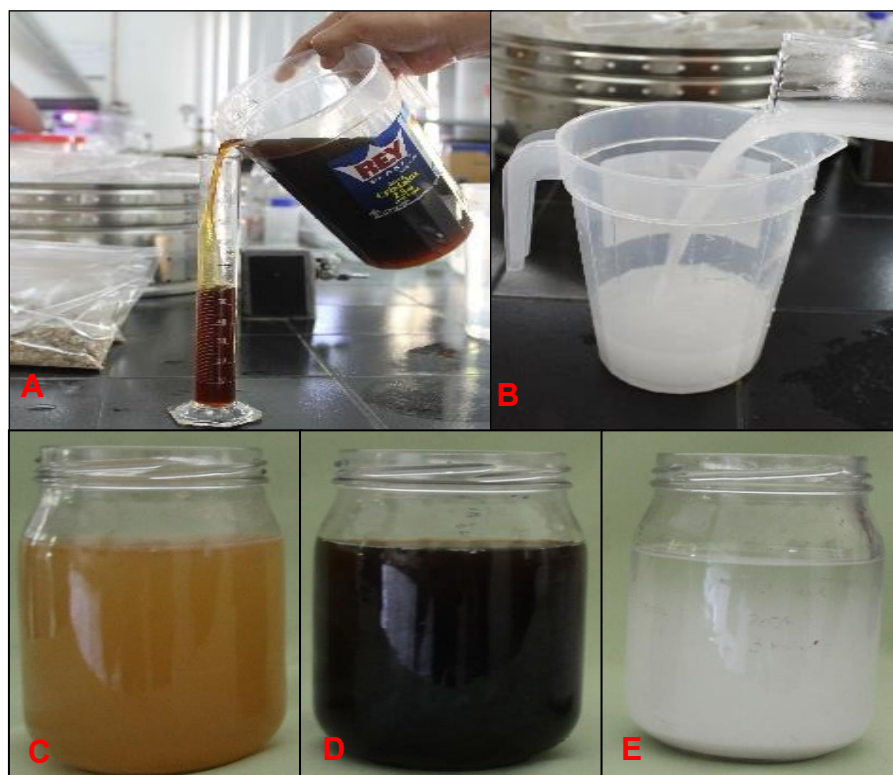
**Cuadro 3:** Volumen de agua empleada según tipo de sustrato.

SUSTRATO	VOLUMEN DE AGUA (ml/g)
Arroz entero	0,17
Ñelen	0,17
Maíz amarillo molido	0,17
Cascarilla de arroz molida + ñelen	0,5
Cascarilla de arroz entero + ñelen	0,5
Aserrín + ñelen	0,5
Coronta de maíz molida + ñelen	0,5
Cáscara de maní molida + ñelen	0,88

Una vez embolsados los sustratos con sus respectivas soluciones, se hicieron dos dobleces a la bolsa y se engraparon a los extremos para luego remover suavemente y facilitar una homogénea distribución de la solución, posteriormente se realizó la esterilización de los sustratos a  $121^{\circ}\text{C} \pm 2$  y 15 lb de presión por 45 minutos.



**Figura 5.** Preparación de sustratos orgánicos A) molienda de sustratos orgánicos. B) pesado de sustratos. C) Engrapado de bolsas. D) y E) mezcla de sustratos



**Figura 6.** Preparación de sustancias enriquecedoras A) Preparación de melaza de caña B) Preparación de carbonato de calcio. C, D y E) Sustancias enriquecedoras

## **Inoculación de los hongos entomopatógenos en los sustratos orgánicos.**

En la sala de siembra donde se realizó el proceso de inoculación de los hongos fueron acondicionados los sustratos orgánicos esterilizados en cámara de flujo laminar, posteriormente se abrió cuidadosamente las bolsas y se aplicó 5 ml del inoculante (figura 7), de la misma manera se trabajó con los tres hongos. Las bolsas fueron removidas para homogenizar el inóculo, después de haber culminado el proceso de inoculación, todas las bolsas con sus respectivas codificaciones se llevaron a la sala de incubación.



**Figura 7.** Inoculación del hongo a los sustratos sólidos A). Absorción de 5 ml de inóculo B). Inoculación del hongo a los sustratos orgánicos.

## **Incubación de los HEP en sustratos orgánicos**

Este proceso consistió en someter a los hongos bajo condiciones controladas básicamente de temperatura, humedad, luz y asepsia. El proceso de incubación consistió en las siguientes etapas:

## Germinación

Después de la inoculación, las bolsas con sustrato fueron conducidas a la sala de incubación donde se acondicionaron en estante para el proceso de germinación. En este ambiente los sustratos permanecieron por tres días a 25-27 °C y en oscuridad.

Al segundo día de la incubación los sustratos mostraron desarrollo de los hongos (figura 8), fue donde se removió suavemente las bolsas para favorecer una buena oxigenación y en efecto mejor germinación de los hongos.



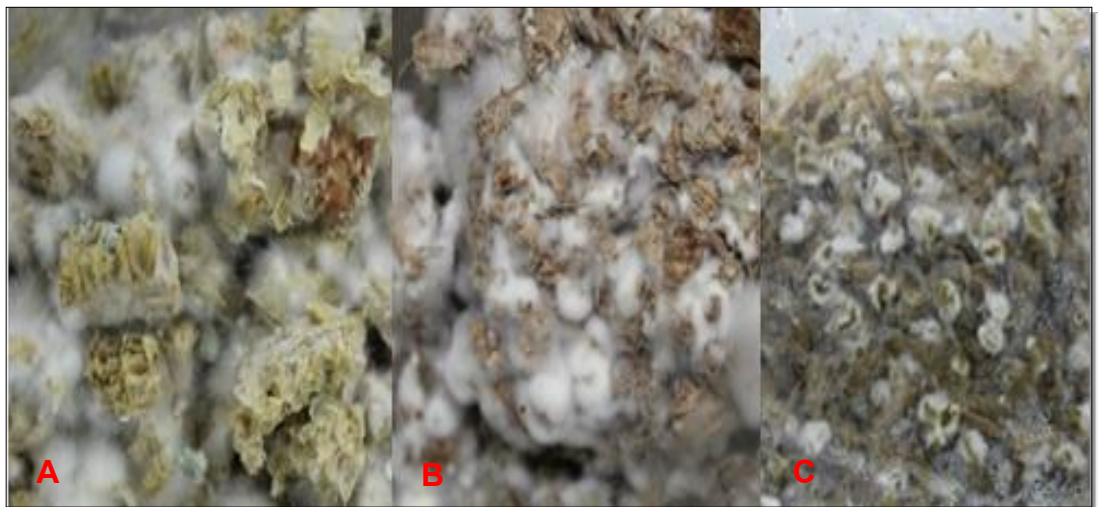
**Figura 8.** Hongos entomopatógenos en germinación A). Maíz molido B). Cascara de Maní molido C). Aserrín D). Ñelen



## Colonización

Después de tres días de la inoculación, los tratamientos fueron ubicados en una sala con luz artificial, previamente tratada con hipoclorito de sodio al 1% y 12 horas de UV para evitar contaminación. Las bolsas fueron abiertas por el borde superior aun conservando las grapas para liberar la humedad y permitir mejor la colonización, éste proceso duró aproximadamente 4 días a temperatura de 27° C.

Las bolsas fueron revisadas diariamente, con la finalidad de observar la colonización de los hongos deseados (figura 9), caso contrario se eliminaron aquellos sustratos que presentaron crecimiento lento y desuniforme, así como las bolsas con presencia de contaminantes.



**Figura 9.** Colonización de hongos en sustratos sólidos A). *Lecanicillium lecanii* en coronta de maíz B). *Lecanicillium lecanii* en Cáscara de maní y C). *Beauveria bassiana* en Cascarilla de arroz + ñelen.

## Esporulación y secado

Para el proceso de esporulación y secado de los hongos entomopatógenos, se cortaron las bolsas por debajo de las grapas con una tijera desinfectada con

alcohol de 96°, se dejaron abiertas las bolsas en la sala de incubación (figura 10), esta fase duro seis días, los últimos cuatro días se sometieron a los diversos tratamientos a 16°C para facilitar su desecación (figura 11).



**Figura 10.** Producción de hongos entomopatógenos



**Figura 11.** Esporulaci3n del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* A). Maíz molido. B). cascarilla de arroz molido C). Cáscara de maní molido D). Aserrín E). Cascarilla de arroz entero F). Coronta de maíz molido.

#### 4.1.6 Variables evaluadas

Después de haber transcurrido 13 días de incubación de los hongos entomopatógenos en bolsas con diversos sustratos, éstas fueron procesadas para su respectiva evaluación. Se cuantificó el número de esporas producidas en los diversos sustratos, utilizando la cámara de Neubauer (French & Herbert, 1980).

#### Obtención de muestras para el conteo de conidios de los HEP.

Consistió en pesar las muestras de tres bolsas de cada tratamiento, para obtener la muestra se removió cuidadosamente el sustrato con el hongo y se extrajo de varios puntos sub muestras hasta completar 1 gramo. Para la toma de sub muestras se empleó una espátula de acero y el pesado se efectuó en una balanza analítica (Figura 12). Con estas muestras se realizó el control de calidad el cual consistió en la evaluación del número de conidias por gramo de sustrato.



**Figura 12.** Obtención de muestras para la evaluación de concentración de conidios. A) Extracción de las muestras de diferentes puntos. B) Vaciando en el tubo de ensayo. C) Pesando 1 g de sustrato en la balanza analítica.

## Recuento de conidios

Se realizó tomando 1g del sustrato con el hongo de cada unidad experimental (bolsa), la muestra fue llevada a un tubo de ensayo con 10 ml. de agua destilada estéril (ADE) + tween al 0.1%, constituyéndose en la dilución  $10^{-0}$ , posteriormente se agitó la muestra en vortex aproximadamente por 30 segundos para facilitar el desprendimiento de las conidias. Luego se realizó la dilución  $10^{-1}$  tomando 1 ml del primer tubo y se le adicionó a un tubo de prueba con 9 ml de Tween al 0.1%, bajo el mismo proceso se consiguió la dilución  $10^{-2}$ . Después de haber concluido con este proceso, las muestras fueron llevadas a la sala de observación. Con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota de la última dilución y se llenó la cámara de Neubauer por capilaridad, luego se llevó al microscopio y se procedió a contar los conidios en el cuadrante central de la cámara, en la que se consideró cinco cuadrados, los 4 de las esquinas y el del centro (figura 13). Con esto se determinó la concentración de conidias por ml mediante la siguiente fórmula

$$\text{N}^\circ \text{ conidios/ml} = \bar{X} * 5 * 10^4 * \text{ID}$$

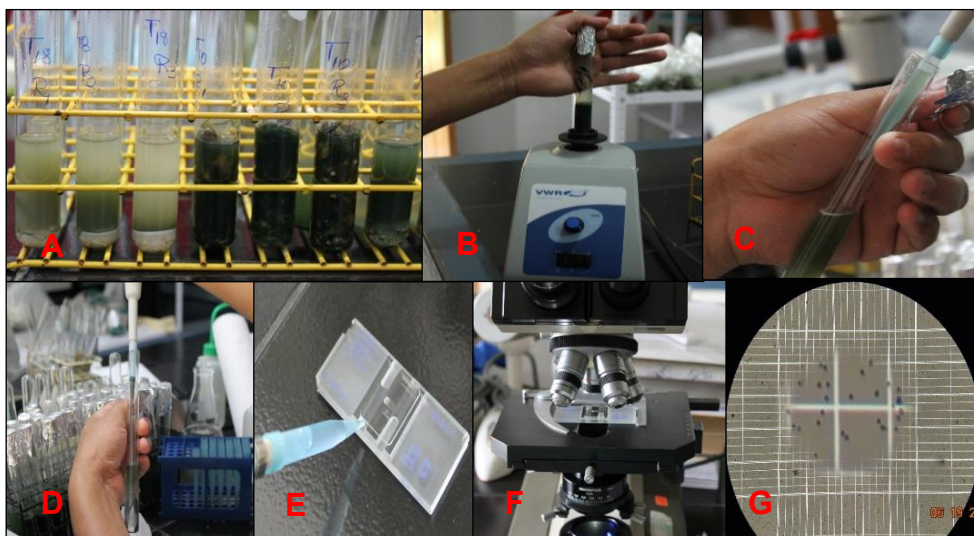
**5** = N° cuadraditos contados en el cuadrante central

$\bar{X}$  = Promedio de conidios contados

**ID** = Inversa de la dilución empleada

Se multiplicó el promedio del número de conidios por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión  $10^{-0}$  y se dividió por el peso de la muestra utilizada.





**Figura 13.** Proceso de extracción de conidios de hongos entomopatógenos de sustratos y conteo en cámara Neubauer. A). Inmersión de la muestra en 10 ml de agua destilada estéril, B, C y D). Diluciones de la muestra, E). Llenado de la cámara Neubauer, F y G). Conteo de conidios en microscopio.

### Porcentaje de germinación

Para la evaluación de porcentaje de germinación o viabilidad de conidios de los hongos se siguió el siguiente proceso: se tomó 0,2 ml de la última dilución  $10^{-2}$  y se sembró en placas Petri conteniendo PDA, se incubó durante 18 horas (figura 14). En la cámara de flujo laminar y con la ayuda de un asa se cortó una porción de agar de  $1 \text{ cm}^2$  y se ubicó sobre un portaobjetos; luego se adicionó una gota de azul de lactofenol y se cubrió con un cubre objeto. Luego se sacaron de 2 a 3 muestras por placa, se llevó al microscopio y se realizó el recuento de conidios germinados y no germinados, contando como mínimo 200 conidios por cada muestra.

Los datos fueron registrados y se sacó un promedio de las lecturas realizadas, se calculó el porcentaje de conidios germinados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} * (100)$$

a = número de conidias germinadas

b= número de conidias sin germinar

Si el resultado es igual o superior al 90 % se considerará que la viabilidad del producto es satisfactorio.



**Figura 14.** Porcentaje de germinación. A). extracción de la segunda dilución del hongo entomopatógeno  $10^{-2}$ . B). Siembra de 0.2 ml de dilución. C). sellado de placas. D) Germinación de los conidias a las 18 horas.

#### **4.1.7 Diseño experimental**

El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con 21 tratamientos, todos con 3 repeticiones para cada uno de los tres hongos entomopatógenos, totalizando 207 unidades experimentales. Cada tratamiento fue considerado como una unidad experimental.

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

Se consideró dos variables a evaluar recuento de conidios y una prueba de porcentaje de germinación, aplicándose la prueba de Duncan para los contrastes de medias, adoptándose el nivel de significancia  $\alpha$  0,01; para lo cual se utilizó el Sistema de Análisis Estadístico (Infostat) versión 1.1.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Producción de conidios de hongos entomopatógenos en diversos sustratos orgánicos.

#### 5.1.1 Producción de conidios de *Beauveria bassiana*.

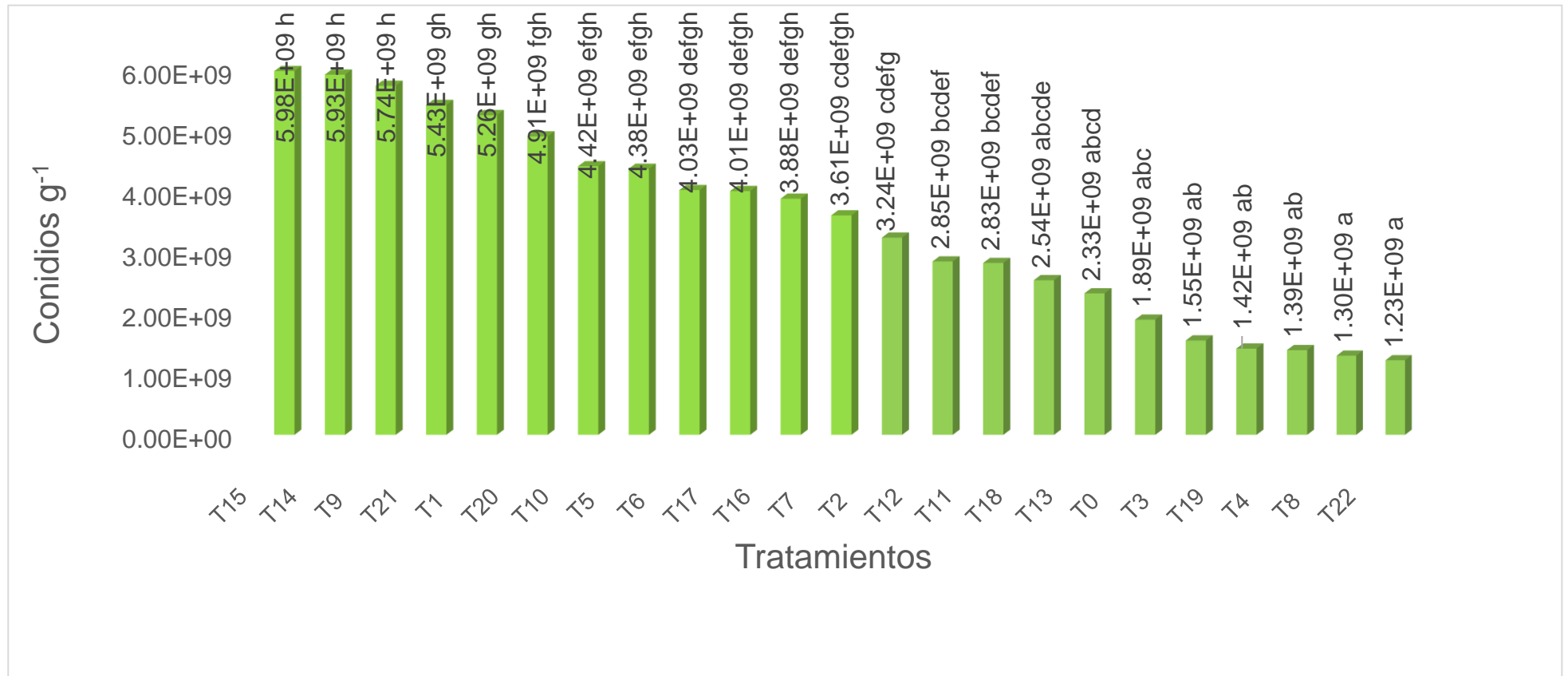
El análisis de varianza realizado para el número de conidios de *Beauveria bassiana* se observa en el cuadro 4, donde se muestran las fuentes de variación (F. V.), suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios, distribución Fisher (F) y el nivel de significación (p valor) .

**Cuadro 4:** Analisis de varianza para el número de conidios del hongo *Beauveria bassiana*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	1,3392E+10	22	608714285	13,36	<0,0001 **
Rep.	46162423,7	2	23081211,8	0,51	0,6059
Error	2004092250	44	45547551,1		
Total	1,5442E+10	68			

$R^2 = 87\%$       C.V. =11,82%

En la figura 15 se observa que todos los tratamientos evaluados de *Beauveria bassiana* lograron obtener una buena producción de conidios, sobresaliendo el tratamiento 15 (cáscara de maní molida + ñelen + levadura de cerveza) con  $5,98 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato.



**Figura 15:** Número de conidios de *Beauveria bassiana* en sustratos a base de residuos orgánicos. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p < 0,01$ )

### 5.1.2 Producción de conidios de *Lecanicillium lecanii*.

En el cuadro 5 se muestra el análisis de varianza para el número de conidios por g de sustrato del hongo *Lecanicillium lecanii*, donde se muestra la fuente de variación (F. V.), suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios, distribución Fisher (F) y el nivel de significación (p valor) .

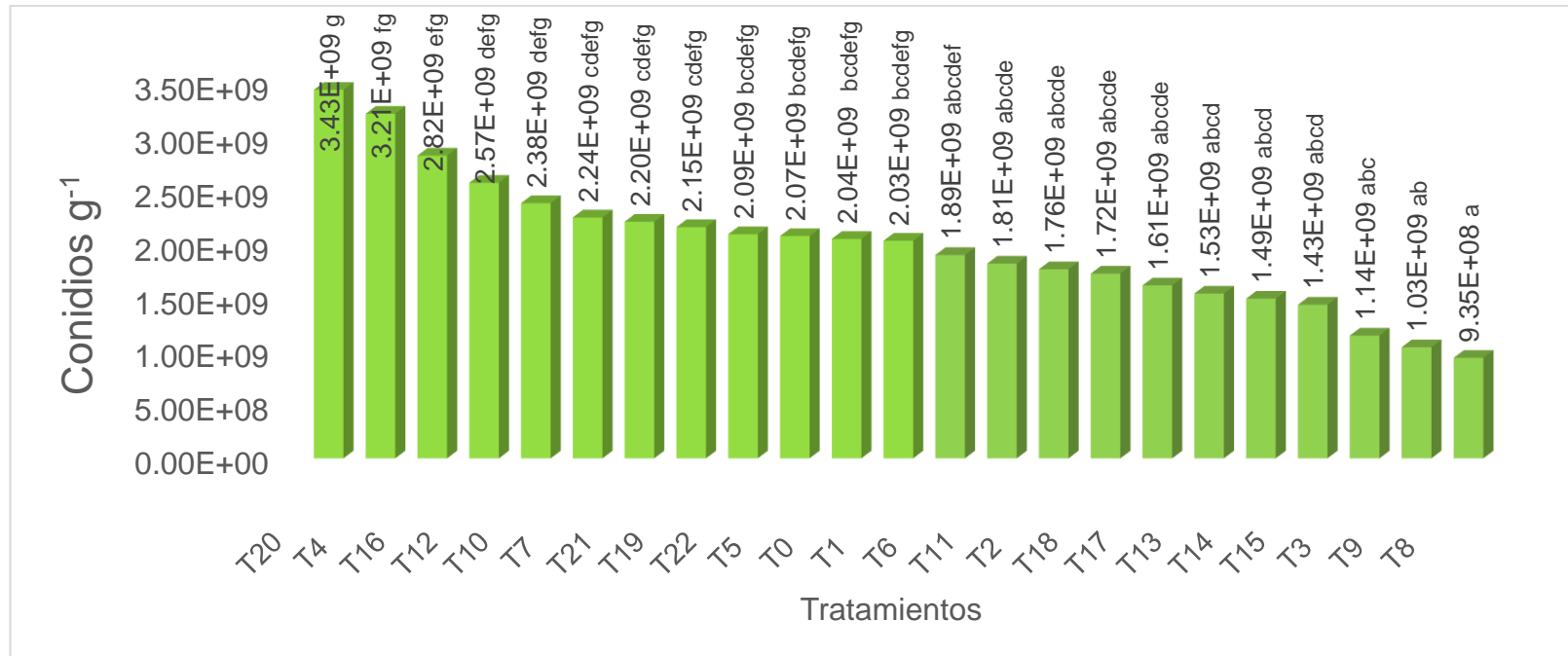
**Cuadro 5:** Analisis de varianza para el número de conidios del hongo *Lecanicillium lecanii*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	3,28E+09	22	1,49E+08	5,26	<0,0001**
Rep.	18683768	2	9341884,1	0,33	0,7211
Error	1,25E+09	44	2,84E+07		
Total	4,55E+09	68			

$$R^2 = 73\%$$

$$C.V. = 12,17\%$$

En la figura 16 se muestra la producción de conidios de *Lecanicillium lecanii* en diversos sustratos. El tratamiento con mayor rendimiento de conidios fue el T20 (Cáscara de maní molida + Ñelen + Melaza de caña), al registrar  $3,43 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato.



**Figura 16:** Número de conidios de *Lecanicillium lecanii* en sustratos orgánicos. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

### 5.1.3 Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*.

En el cuadro 6 se observa el Análisis de Varianza para la producción de conidios *Metarhizium anisopliae*, mostrándose fuente de variación (F. V.), suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios, distribución Fisher (F) y el nivel de significación (p valor) .

**Cuadro 6:** Analisis de varianza para el número de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae*.

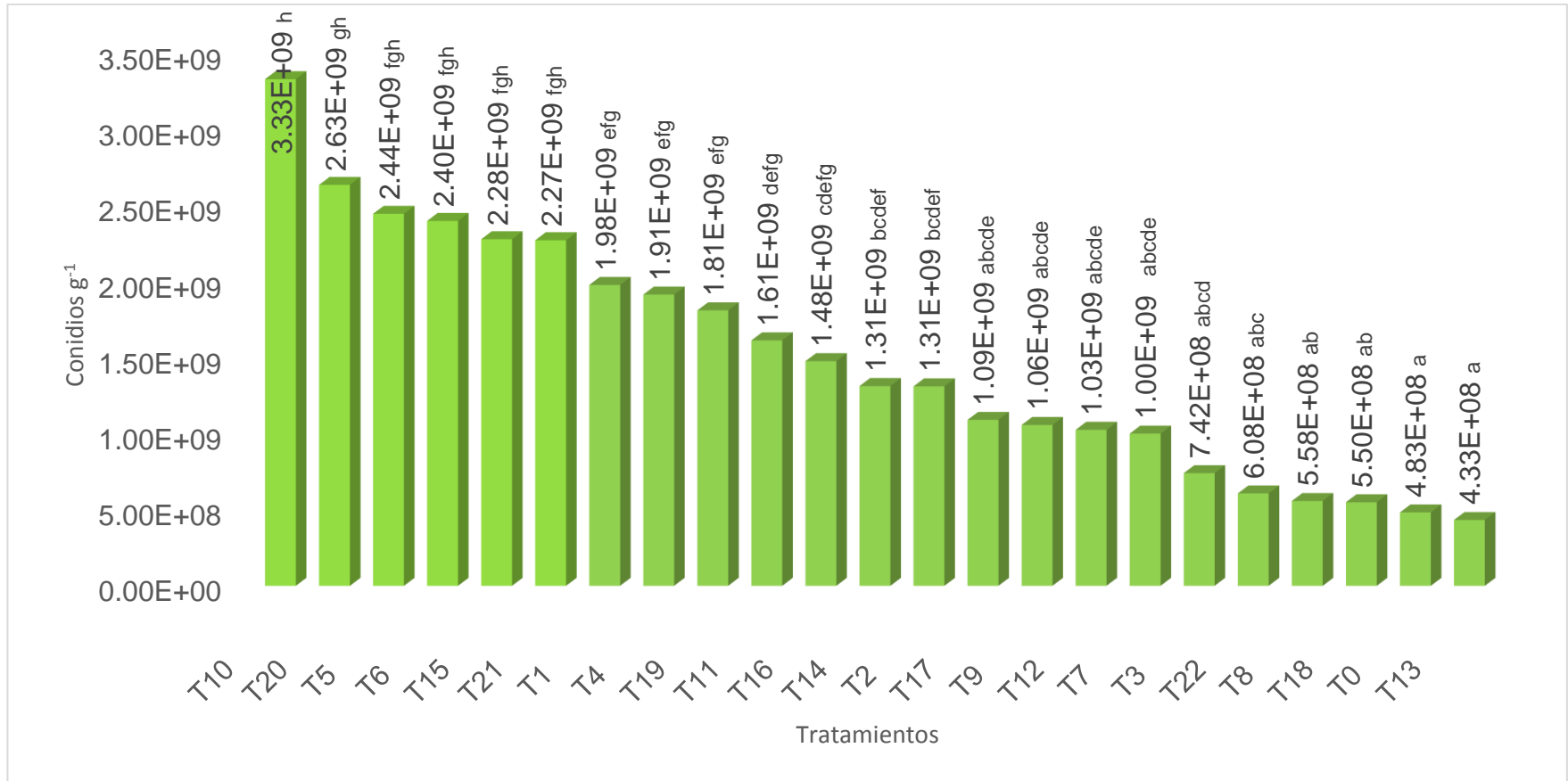
F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	7,42E+09	22	337275152	11,88	<0,0001 **
Rep.	2,36E+07	2	11778406	0,42	0,6629
Error	1,25E+09	44	28380072,5		
Total	8,69E+09	68			

$R^2 = 86\%$

C.V. =14,42%



La figura 17 muestra que el T10 (Cáscara de maní molida + Ñelen + CaCO<sub>3</sub>) es el mejor sustrato en producción para *Metarhizium anisopliae* con 3,33 x 10<sup>9</sup> conidios g<sup>-1</sup>.



**Figura 17:** Número de conidios de *Metarhizium anisopliae* en sustratos orgánicos. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

## 5.2 Germinación de conidios de los hongos entomopatógenos.

### 5.2.1 Porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria bassiana*.

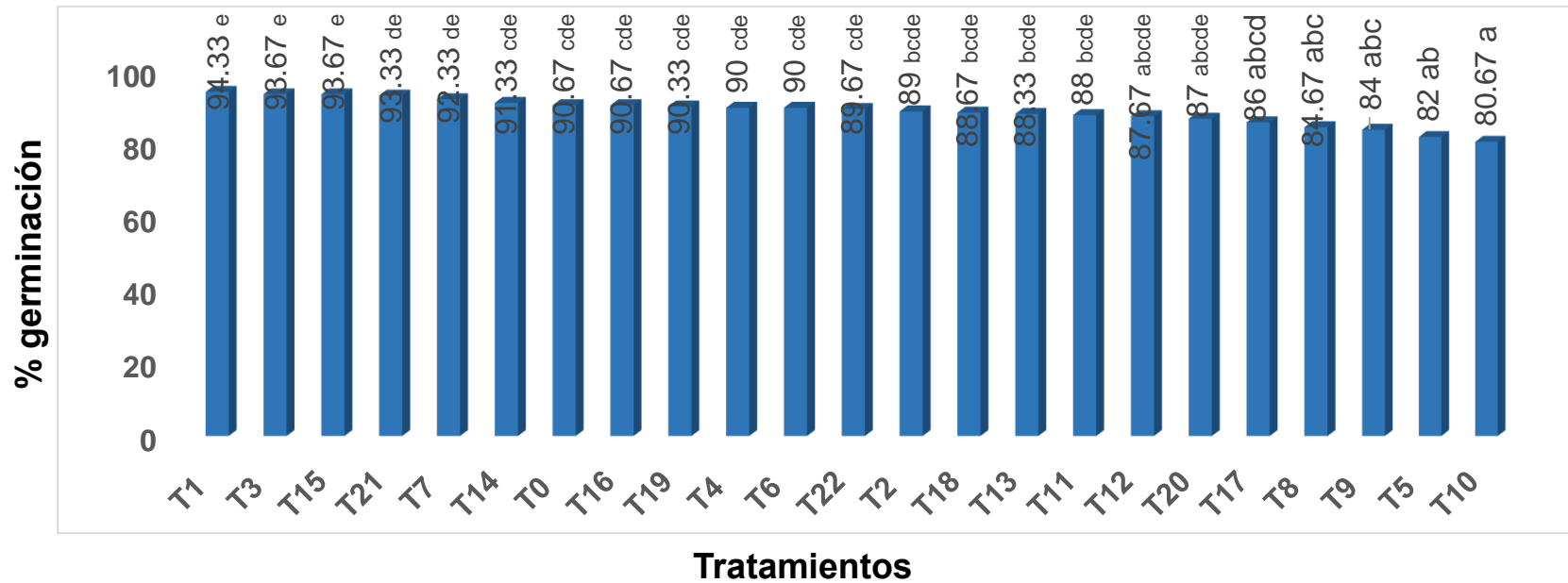
En el cuadro 7 se muestra el Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria bassiana*. (Cuadro 7), mostrándose fuente de variación (F. V.), suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios, distribución Fisher (F) y el nivel de significación (p valor).

**Cuadro 7:** Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria bassiana*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Tto.	886,87	22	40,31	4,95	<0,0001**
Rep.	46162423,67	2	23081211,83	0,51	0,6059
Error	358,17	44	8,14		
Total	1246,87	68			

$$R^2 = 71\% \quad C.V. = 3,21\%$$

En la siguiente figura 18 se muestra el porcentaje de germinación de conidios en los diversos sustratos orgánicos; siendo el T1 (cascarilla de arroz molida) quien presento una mejor germinación con 94,33 %.



**Figura 18:** Porcentaje de germinación de conidios de *Beauveria bassiana* producidos en diversos sustratos orgánicos después de 18 horas de incubación. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ).

### 5.2.2 Porcentaje de germinación de conidios de *Lecanicillium lecanii*.

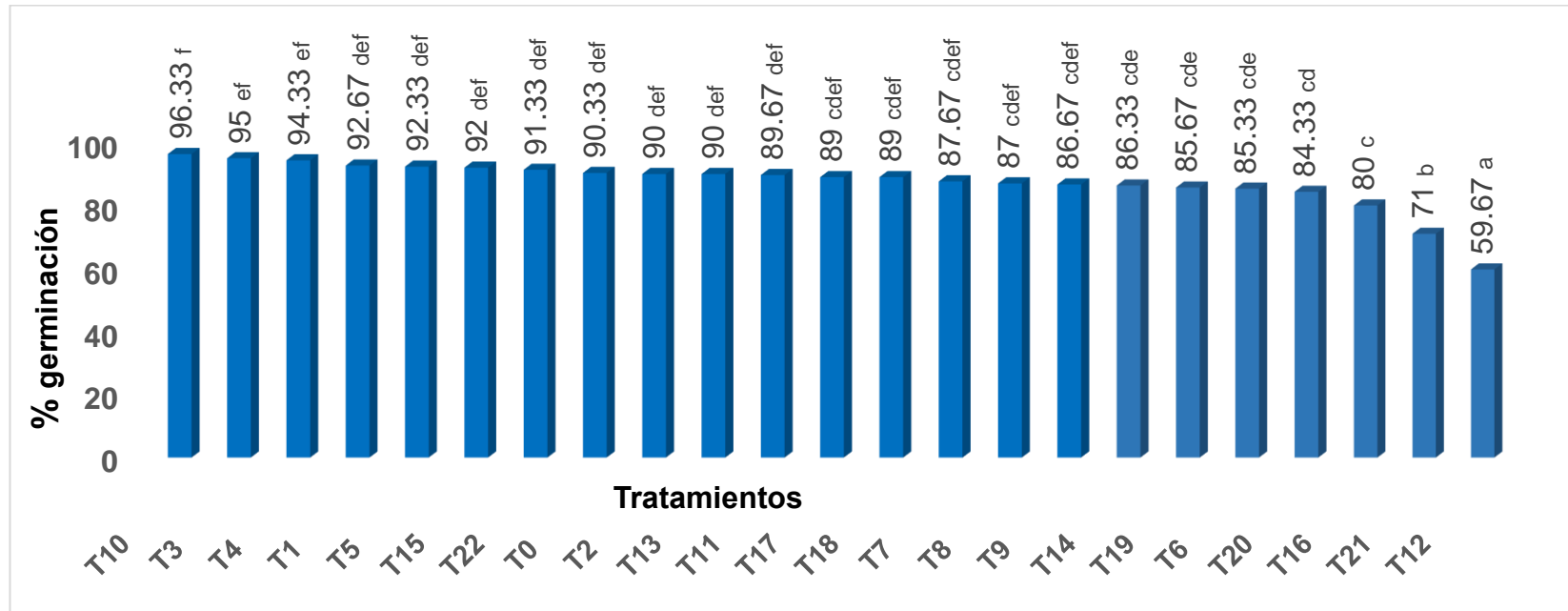
En el cuadro 8 se observa el análisis de varianza para el porcentaje de germinación del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* sometidos a oscuridad, mostrándose fuente de variación (F. V.), suma de cuadrados (SC), grados de libertad (gl), cuadrados medios, distribución Fisher (F) y el nivel de significación (p valor) .

**Cuadro 8.** Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Lecanicillium lecanii*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	4251,83	22	193,26	14,06	<0,0001**
Rep.	52,55	2	26,28	1,91	0,1599
Error	604,78	44	13,75		
Total	4909,16	68			

R<sup>2</sup> = 88%      C.V. = 4,25%

La figura 19 registra el porcentaje de germinación de los conidios del hongo *Lecanicillium lecanii* producida en diversos sustratos orgánicos, siendo diez tratamientos los que superaron el 90% de germinación a las 18 horas después de haber sido incubado.



**Figura 19:** Porcentaje de germinación de conidios *Lecanicillium lecanii* producidos en los diversos sustratos orgánicos a las 18 horas de haber sido incubado a plena oscuridad. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p \leq 0.01$ ).

### 5.2.3 Porcentaje de germinación de conidios de *Metarhizium anisopliae*.

El Análisis de Varianza para el porcentaje de germinación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* producidos en diversos sustratos orgánicos, mostraron efecto significativo en los tratamientos evaluados (cuadro 9).

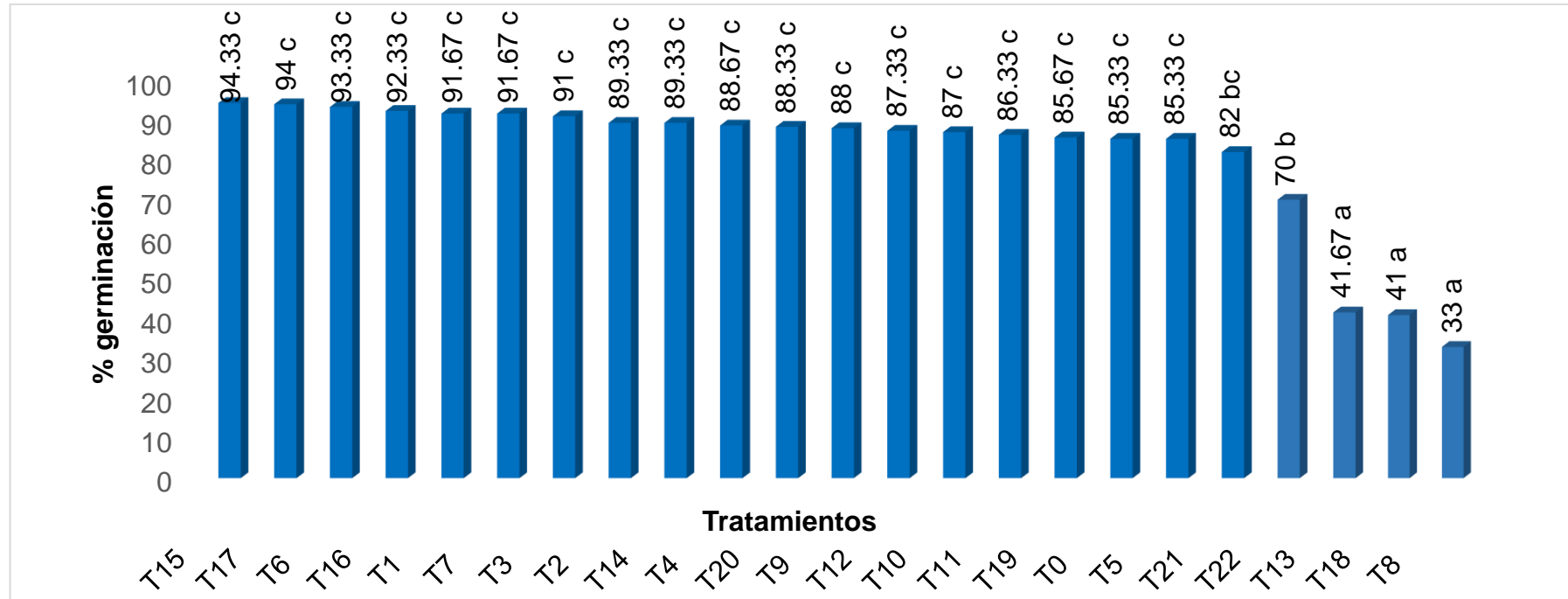
**Cuadro 9.** Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidios de *Metarhizium anisopliae*, desarrolladas en 18 horas de incubación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	2,10E+04	22	952,39	30,98	<0,0001**
Rep.	2,10E+02	2	104,75	3,41	0,0421
Error	1,35E+03	44	30,74		
Total	2,25E+04	68			

$R^2 = 94\%$

C.V. =6,79%

En la figura 20 se muestra el porcentaje de germinación de los conidios del hongo *Metarhizium anisopliae* producida en diversos sustratos orgánicos, siendo el tratamiento 15 el que presento mayor porcentaje de germinación.



**Figura 20:** Porcentaje de germinación de conidios *Metarhizium anisopliae* producidas en los diversos sustratos orgánicos a las 18 horas de haber sido incubado a plena oscuridad. Letras distintas indican diferencias significativas prueba de Duncan ( $p \leq 0.01$ ).

## VI. DISCUSIONES

### 6.1 Producción de conidios de hongos entomopatógenos en diversos sustratos orgánicos.

#### 6.1.1 Producción de conidios de *Beauveria bassiana*.

La concentración media de conidios de *Beauveria bassiana* producida en diversos sustratos orgánicos, se expresó entre  $1,23 \times 10^9$  y  $5,98 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato. En la Figura 15 se puede apreciar que todos los tratamientos presentaron mínimas diferencias significativas entre sí.

La mayor producción de conidios desarrollados en los tratamientos (T15, T14 y T9), se originaron debido a las condiciones adecuadas que presentaron el nicho y hábitats. Tanto las levaduras, el  $CaCO_3$  y ñelen, llamadas sustancias nutritivas, fue el sustento necesario, que sirvió de base para su respectivo crecimiento y desarrollo de los conidios. La cáscara de maní molida y coronta de maíz molida proporcionó mayor textura, mayor porosidad y por consiguiente mayor oxigenación, concordando con Porcayo-Loza (2012), quién menciona que usando rastrojo de maíz en comparación con arroz, presenta mayor porosidad. Una mayor oxigenación estará en directa relación con una mayor producción de conidios.

La interrelación del sustrato y sustancias nutritivas fomentó mayor multiplicación de los conidios (T15 con  $5,98 \times 10^9$ , el T14 con  $5,93 \times 10^9$  y el T9 con  $5,74 \times 10^9$ ), dichos resultados son corroborados por Cintra *et al.*, (2001), quienes afirman, que el uso de sustancias nutritivas más la adición de sustratos orgánicos tienen inferencia en la producción e incremento de los conidios; es



decir sustratos que tienen mayor textura, tendrán mayor porosidad y por consiguiente mayor será la oxigenación, aunado a las sustancias nutritivas se prevé mayor incremento y producción de los conidios.

La cantidad de conidios producidos, guarda relación con lo manifestado por Monzón (2001), quien menciona que el rendimiento de conidios por gramos de sustrato depende de la cepa y el estado de la misma y puede variar desde  $5 \times 10^3$  hasta  $2,5 \times 10^{11}$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato; siendo dichas producciones semejantes a lo obtenido en el presente trabajo. Dichos resultados tienen similitud con Gandarilla-Pacheco (2012) quien obtuvo concentraciones de conidios con promedios de  $10^8$  y  $10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato. Sin embargo Grabowski (2005), argumenta que el sustrato compuesto por (arroz + caña de azúcar triturada), disminuyó la producción de conidios a  $16,50 \times 10^6$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato), atribuyéndose dicha disminución a la inherencia de la fermentación de la caña de azúcar.

El T22 fue el que aportó menor producción de conidios, debido a que el hábitat y el nicho estuvo constituido por el ñelen, cuyo sustrato no aportó la textura y la porosidad necesaria para la oxigenación, debido a esta limitación disminuyó la producción de conidios.

El testigo (T0), presentó una concentración de  $1,89 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato superando a cinco de los tratamientos evaluados (T3, T19, T4, T8 y T22) con una concentración de  $1,55$ ;  $1,42$ ;  $1,39$ ;  $1,30$  y  $1,23 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato respectivamente.

### 6.1.2 Producción de conidios de *Lecanicillium lecanii*

La Figura 16 nos muestra la producción de conidios de *Lecanicillium lecanii* en los diversos tratamientos. Los resultados del análisis estadísticos logró dilucidar las diferencias significativas existentes en cuanto a concentración de conidios producidas por *Lecanicillium lecanii* en respuesta a los tratamientos utilizados.

La concentración media de conidios de *Lecanicillium lecanii* producida en diversos sustratos orgánicos, se expresó entre  $9,35 \times 10^8$  y  $3,43 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato.

La mayor producción de conidios desarrollados en los tratamientos (T20, T4, T16), se originaron debido a las condiciones adecuadas que presentaron el nicho y hábitats. Tanto la melaza de caña y ñelen, llamadas sustancias nutritivas, fue el sustento necesario, que sirvió de base para su respectivo crecimiento y desarrollo de los conidios, esto concuerda con lo mencionado por Tlecutil (2010) quien menciona que la producción de conidios en distintas especies de hongos entomopatógenos se ve afectado por diversos factores entre ellos los nutricionales.

La cáscara de maní molida, la coronta de maíz molido y la cascarilla de arroz molida provocó mayor textura, mayor porosidad y por consiguiente mayor oxigenación, trabajo similar realizo Cortez- Madrigal (2007) quien evaluó sorgo, grano de arroz entero y grano de arroz quebrado usando como soporte cascarilla de arroz, bagazo de caña y olote de maíz teniendo como resultados concentraciones entre  $(1,2 \text{ y } 1,7 \times 10^6)$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato) obteniendo concentraciones inferiores.

La cantidad de conidios producidos, guarda relación con lo manifestado por Cuapio (2011), quien menciona que la mejoría en el rendimiento y esporulación de hongos entomopatógenos no solo depende del aislado del hongo sino que depende también del sustrato que se emplea. La producción de conidios depende mucho de las características del sustrato que se emplee.

El T8 fue el que aportó menor producción de conidios con una concentración de  $9,35 \times 10^8$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, debido a que el hábitat y el nicho estuvo constituido por maíz amarillo molido, cuyo sustrato no aportó la textura y la porosidad necesaria para la oxigenación., debido a esta limitación disminuyó la producción de conidios. Este sustrato presenta diferencia significativa con relación a los tratamientos que produjeron altas concentraciones de conidios del hongo *Lecanicillium lecanii*.

El sustrato arroz entero (testigo) se diferenció estadísticamente del tratamiento de mayor producción, presentando una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos.

Cabe mencionar que las concentraciones de conidios en veintidós tratamientos superaron a  $1 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, esto concuerda con lo expresado por Gómez *et al.* Quien menciona que concentraciones de conidios mayores o igual a  $1 \times 10^9$  están siendo aptas para campo. Por lo tanto la producción de conidios de *Lecanicillium lecanii* viene siendo muy aprovechable.

### 6.1.3 Producción de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae*

La Figura 17 presenta el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* en los diferentes tratamientos. La concentración media de conidios de *Metarhizium anisopliae* producida en diversos sustratos orgánicos, se expresó entre  $4,33 \times 10^8$  y  $3,33 \times 10^9$  conidios  $\text{g}^{-1}$  de sustrato, Monzón (2001) menciona que este rendimiento está determinado por la cepa y el estado de la misma y varía desde  $5 \times 10^9$  hasta  $2,5 \times 10^{11}$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , es decir que la producción de conidios de éste trabajo se encuentra en el estándar de producción.

La mayor producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* fueron en los tratamientos (T5, T10 y T20), siendo el sustrato principal para los tres tratamientos la cascara de maní molida demostrándose que tiene mayor facilidad de desarrollo en este insumo orgánico debido a su textura y su porosidad, produciéndose una mayor oxigenación, siendo éste el nicho y hábitats adecuado para su producción. Tanto la melaza de caña, el  $\text{CaCO}_3$  y ñelen, llamadas sustancias nutritivas, fue el sustento necesario, que sirvió de base para su respectivo crecimiento y desarrollo de los conidios; esto concuerda con Sahayara *et al.*, (2008) quienes mencionan que el uso de las sustancias nutritivas son de gran importancia debido a su alto valor en su composición nutricional como el hidrato de carbono, proteínas y altas cantidades significativas de sales y vitaminas que hacen que sea atractivos para la producción de conidios de hongos entomopatógenos, además Shah *et al.*, (2005) consideran que los factores nutricionales afectan la germinación de los conidios. Lo mismo menciona Ibrahim *et al.*, (2002). Es decir que las

sustancias nutritivas cumplen un gran valor nutricional produciendo así mayor producción de conidios.

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

La producción de conidios del presente trabajo superó los datos obtenidos por Grabowski (2005), quien cita una menor producción para este hongo ( $45,7 \times 10^6$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato), en el sustrato compuesto por arroz + harina de maíz + caña de azúcar triturada. Pero, Sandoval-coronado (2011), obtuvo resultados similares con  $3,5 \times 10^9$  y  $3,4 \times 10^9$ .

El sustrato que permitió la mayor producción de conidios fue la compuesta por cascara de maní molida + ñelen +  $CaCO_3$  correspondiente al tratamiento T10, la misma promedió una concentración de  $3,33 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato. Este resultado no concuerda con Tlecutil (2010), quien logro obtener concentraciones de conidios ( $4,25 \times 10^7$  conidios  $g^{-1}$ ) por debajo de lo obtenido.

Rangel *et al.*, (2006) nos menciona que encontraron fuentes preferenciales de carbono, como glucosa, que permiten producir niveles altos de conidios, esto concuerda con Cintra *et al.*, (2001), donde afirma que el uso de aditivos en medios de cultivo de arroz para la producción de *Metarhizium anisopliae* aumenta la esporulación de los hongos. Los productos enriquecedores pudieron haber sido un factor para una buena producción de conidios.

## **6.2 Porcentaje de germinación de los hongos entomopatógenos**

### **6.2.1 Porcentaje de germinación de *Beauveria bassiana*.**

En la figura 18, se muestra los resultados estadísticos de la evaluación de porcentaje de germinación, mostraron que el T1 (cascarilla de arroz molida + ñelen) presenta el primer lugar con porcentaje de germinación de 94,3 % y siendo éste mismo tratamiento el que se encuentra con una concentración de conidios de  $5,26 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato. Lo que concuerda con Gómez *et al.*; (2011); nos menciona que el porcentaje de germinación tiene mayor o igual al 90%, es decir el porcentaje de germinación es un indicador de que el conidio no presento ningún retraso en su desarrollo para luego ser usado en posteriores aplicaciones.

Cabe mencionar que once tratamientos (T0, T1, T3, T4, T6 T7, T14, T15, T16, T19 y T21) superaron el límite estándar de porcentaje de germinación con un promedio de 90% hasta un 94,33%, esto concuerda con Sandoval-Coronado *et al.*, 2011 quienes mencionan que los porcentajes de germinación por lo general se presentan con buena viabilidad por arriba del 90%. El tratamiento con menor porcentaje de germinación fue el T10 con un 80,6% germinación.

### **6.2.2 Porcentaje de germinación *Lecanicillium lecanii***

En la Figura 19, se denota el porcentaje de germinación de *Lecanicillium lecanii*, producida en los diversos sustratos orgánicos. De los veintitrés tratamientos evaluados diez de ellos superaron el 90% de porcentaje de germinación. Siendo los mejores el T10 (cáscara de maní molida + ñelen + CaCO<sub>3</sub>) y el T3 con 96,33% y 95%, a diferencia de los demás tratamientos que mostraron una germinación por debajo de o igual a 89,67%, y el de menor resultado obtenido fue el T12 (aserrín + ñelen + levadura de cerveza) que no lograron obtener una germinación mayor a 90%. Gómez *et al.*, (2011) nos mencionan que si el resultado es igual o superior al 90 % se considerará que la viabilidad del producto es satisfactorio, es decir aquellos sustratos orgánicos con una germinación igual o mayor de 90% serán los tratamientos con mejores características.

### **6.2.3 Porcentaje de germinación de *Metarhizium anisopliae***

En la figura 20, se muestra el porcentaje de germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae*. Los seis mejores tratamientos mostraron una germinación de 91% a 94,33%, siendo el T15 (cáscara de maní molida + ñelen + Levadura de cerveza) y el T17 quienes se encuentran como los dos tratamientos con mayor porcentaje de germinación con 94,33% y 94% respectivamente, Similares resultados presentaron Sandoval-Coronado, 2011 con un porcentaje de germinación entre 81,4% y 98,34% correspondientes a sus tratamientos. Gómez *et al.*, (2011) nos menciona que si el resultado es igual o superior al 90 % se considerará que la viabilidad del producto es satisfactorio.

Es decir que los porcentajes de germinación por lo general son los mejores encontrándose por arriba del 90%,

El T8, T13 y T18 fueron los tratamientos con resultados más bajos con 33%, 41% y 41,67% respectivamente, esto indica que el sustrato empleado no cuenta con buenas características.



## VII. CONCLUSIONES

- 7.1** Todos los tratamientos evaluados para el hongo *Beauveria bassiana* estuvieron por encima del  $1 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, siendo la cáscara de maní molida + ñelen + levadura de cerveza el sustrato que estuvo por delante en producción de conidios de dicho hongo con  $5,98 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, pero solo 11 tratamientos (T1, T3, T15, T21, T7, T14, T0, T16, T19, T4 Y T6) estuvieron por encima del 90 % de germinación.
- 7.2** *Lecanicillium lecanii* tuvo buenos resultados en 22 tratamientos evaluados para la producción de conidios, reportando concentraciones entre  $1,03$  a  $3,4 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, siendo la cascara de maní molida + ñelen + melaza de caña quien se ubicó en primer lugar para la producción de conidios, de éstos tratamientos solo diez de ellos (T10, T3, T4, T1, T5, T15, T22, T0, T2 y T13) presentaron porcentaje de germinación igual o por encima del 90%
- 7.3** La producción de *Metarhizium anisopliae*, alcanzó concentraciones de conidios por encima de  $1 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato en 17 tratamientos, reportando concentraciones entre  $1 \times 10^9$  a  $3,33 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, siendo la cascara de maní molida + ñelen +  $CaCO_3$  el sustrato que sobresalió en cuanto a la producción de conidios, teniendo solo 7 tratamientos (T15, T17, T6, T16, T1, T7 y T3) que alcanzaron a obtener una germinación igual o mayor al 90%.
- 7.4** Los tratamientos evaluados nos proporcionaron una concentración de conidios igual o mayor a 90%, siendo estos sustratos más económicos y eficientes que el tradicional (arroz) para la producción de los tres hongos entomopatógenos.

## VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1** Realizar posteriores trabajos de investigación efectuando un análisis químico de los sustratos orgánicos empleados en el presente trabajo obteniendo así los compuestos que presentan favoreciendo la producción de hongos entomopatógenos.
  
- 8.2** Continuar investigando otros sustratos orgánicos que sean abundantes y económicos en nuestra región de San Martín. Por ejemplo la pulpa de café y cacao.
  
- 8.3** Implementar laboratorios con equipos especializados para la investigación de nuevas especies de hongos entomopatógenos que sean empleadas en cultivos de nuestra región de San Martín.

## IX. RESUMEN

Se evaluó la eficiencia de sustratos orgánicos para la producción de conidios de hongos entomopatógenos. Se utilizaron sustratos sólidos a base de residuos orgánicos como arroz entero, ñelén, cascarilla de arroz entera y molida, aserrín (huairuro y papelillo), maíz amarillo molido, coronta de maíz molido y cáscara de maní molida. La mejor producción de conidios de *Beauveria bassiana* se presentó en el sustrato cáscara de maní molida + ñelén enriquecido con levadura de cerveza con una concentración de  $5,98 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, para *Lecanicillium lecanii* se presentó en el sustrato cáscara de maní molida + ñelén enriquecido con melaza de caña llegando a tener una concentración de  $3,43 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato y para *Metarhizium anisopliae* se registró mayor producción de conidios en el sustrato compuesto por cáscara de maní molida + ñelén enriquecido con carbonato de calcio con una concentración de  $3,3 \times 10^9$  conidios  $g^{-1}$  de sustrato, para determinar la producción de conidios se hizo uso de una cámara de Neubauer, donde se realizó el recuento de conidios y para determinar el porcentaje de germinación se hizo uso de un microscopio.

**Palabras claves:** Hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, producción de conidios.

## X. SUMMARY

Efficiency of organic substrates for the production of conidia of entomopathogenic fungi was assessed.

We used solid substrates using organic waste as whole rice polishing, nelen, husks and ground whole rice, composed of huairuro and papelillo sawdust, ground yellow corn, ground corn cob and peanut shell ground.

The best conidial production of *Beauveria bassiana* is presented in the peanut shell substrate + nelen ground yeast enriched with a concentration of  $5.98 \times 10^9$  conidia  $g^{-1}$  substrate, for *Lecanicillium lecanii* presented in the shell substrate Nelen ground + enriched peanut cane molasses getting to have a concentration of  $3.43 \times 10^9$  conidia  $g^{-1}$  substrate and greater *Metarhizium anisopliae* conidia production was recorded in the substrate composed of ground peanut shells Nelen + enriched with calcium carbonate with a concentration of  $3.3 \times 10^9$  conidia  $g^{-1}$  substrate, determining conidia production was done using a Neubauer chamber, where the conidia count was performed and to determine the germination percentage was made using a microscope.

Keywords : entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, conidia production.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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. Tesis de Licenciatura en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia. pp 116.
2. Alatorre-Rosas, R. 2006. Insecticidas microbianos en el manejo de insectos plaga. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
3. Angel – Cuapio, R. A. (2011). Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante.
4. Badii, M. H., Abreu, J. L. (2006). Biological control a sustainable way of pest control. International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.
5. Barajas, C. G., Pozo, E. M., García, I. y Méndez, A. (2010). Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. Rev. Protección Veg. 25: 174-180.
6. Calzada, (1982). Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S.A. Lima-Perú. 644 pp.
7. Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos Entomopatógenos. Pub. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima – Perú Pág. 62

8. Carballo, M., Guaharay, F., López, J. (2004). Control biológico de plagas Agrícolas, Costa Rica, CATIE. 184p.
9. Castro, L. M., (2013).Control de calidad en los procesos de producción de hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica.
10. Cintra, E., Almeida, J., Batistafilo, A. (2001). Efeito de aditivos no meio de cultura de arroz para a produção dos fungos *Mefarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Sao Paulo, BR.
11. Cortez – Madrigal, H. (2007). Production of *lecanicillium* (=Verticillium) *lecanii* in different media and pathogenicity. Agricultura Técnica en México, vol. 33, núm. 1, pp. 83-87
12. Elizalde – Blancas, V. (2006). Signos y síntomas causados por hongos entomopatógenos en insectos hospederos. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): control de calidad. Manzanillo Colima.
13. Fajardo, C. E. y Sarmiento F. S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias Básicas Microbiología industrial. Bogotá, D.C.
14. Faria, M., Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides. A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43: 237-256.
15. French, E., Hebert, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José, CR: 289 p.

16. García – García, M. A., Cappello – García, S., Lesher – Gordillo, J. M., y Molina Martínez, R. F. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. 25-28.
17. García, N. (2012). Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmósferas oxidantes.
18. Giraldo, J. (2009). Uso de hongos entomopatógenos en el control de ectoparásitos. Universidad del Tolima. Artículo de divulgación, Revista Ganadero. Tolima, Colombia. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/uso-hongos-entomopatogenos-control-t2540/p0.htm>
19. Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., Soberanís, W. (2011). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Servicio nacional de sanidad agraria. Perú.
20. Grabowski, O. C., Lorenza, A., Orrego, F., Stauffer, B.A. (2005). Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *metarhizium anisopliae* y *paecilomyces* sp. Investigación Agraria, Vol 7. Num 1.
21. Ibrahim, L., Butt, M. T. y Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research. 106 (6), 705-715.
22. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Manejo integrado de las moscas blancas *Bemisia tabaco* y *Aleurotrachelus sociales*. Colombia: Ministerio de agricultura y desarrollo rural; 2005.

23. Ipni, 2014. Fuentes de Nutrientes Específicos Carbonato de Calcio. Vol 18.  
Consultado el 30 septiembre del 2015 a las 5:00 pm. Disponible en:  
[https://www.ipni.net/publication/nsses.nsf/0/0248CCB8DFC442E985257BBA0059D03A/\\$FILE/NSS-ES-18.pdf](https://www.ipni.net/publication/nsses.nsf/0/0248CCB8DFC442E985257BBA0059D03A/$FILE/NSS-ES-18.pdf).
24. Leger, St. R. J. (2007). *Metarhizium anisopliae* as a Model for Studying Bioinsecticidal Host Pathogen Interactions. In: Capitulo de libro: Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management Pag. 179.
25. Mena, S. M. (2010). Evaluación de Hongos Entomopatógenos como potencial biocontrolador de la Hormiga Arriera *Atta* Colombia (G.) del Municipio de Lloró – Chocó. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Agonomía Bogotá, D. C.
26. Monzón, A. (2001). Manejo integrado de plagas producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Managua, Nicaragua.
27. Montesinos-Matías, R., Viniestra-González, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. World Journal of Microbiology and Biotechnology.
28. Morales, V., Garay, B., Romero, A., Sánchez, J. (2009). Insecticidas biológicos en el control de insectos plaga: agrícolas, forestales, de almacén y urbanas en México. Artículo científico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 1-5.



29. Natursan, 2008. Levadura de Cerveza, propiedades, y beneficios. Consultado el 26 septiembre del 2015 a las 6:08 pm. Disponible en [www.natursan.net/levadura-de-cerveza-propiedades-y-beneficios-mas-importantes/](http://www.natursan.net/levadura-de-cerveza-propiedades-y-beneficios-mas-importantes/).
30. Peralta, M. F., Miazzo, R. D. y Nilson, A. (2008). Unidad de Investigación Aviar, Depto. de Producción Animal, Fac. de Agr. y Vet. Universidad Nacional de Río Cuarto. 5800- Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Email: [mperalta@ayv.unrc.edu.ar](mailto:mperalta@ayv.unrc.edu.ar)
31. Prakash, B. G. V. S., Padmaja, V. y Kiran, S. R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid- state fermentation. *Bioresource Technology*. 99, 1530-1537.
32. Pucheta, M., Flores Macias, A., Rodríguez Navarro, S., De la Torre, M. (2006). Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860
33. Rangel, D. E. N., Anderson, A. J. y Roberts, D. W. (2006). Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93, 127-134.
34. Rodríguez, L.A., y Arredondo, H.C. B. (2007). Teoría y Aplicación del Control Biológico. México. 1ra ed. Pag. 303.
35. Sandoval – Coronado, C., quintero-zapata, I., Elías Santos, M., Maldondo – Blanco, M., Lozano – Contreras, M., Galán – Wong, L. (2011). Producción en cultivo sólido de *Metarhizium anisopliae* en grano de arroz cocido a diferentes concentraciones de agua. Universidad

autónoma de Nuevo León, Facultad de ciencias biológicas, instituto de Biotecnología. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

- 36.** Shah, F. A., Wang, C. S. y Butt, T. M. (2005). Nutrition influence growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters.
- 37.** Tellez, D. 2004. Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín – Industria de licores del Valle. Universidad del Valle. Tesis pregrado Bacteriología. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali. Cali, Colombia. 79p.
- 38.** Tlecuitl, B. S. (2010). “Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos con concentraciones modificadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.”
- 39.** Urtubia, H., France, A. (2007), formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en Agricultura. INIA Tierra adentro. Noviembre-diciembre.

## XII. ANEXOS

<b>COSTO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN SUSTRATOS ORGÁNICOS/Kg.</b>	
<b>INSUMOS</b>	<b>COSTO</b>
Residuo orgánico (cascarilla de arroz entera)	0.0675
Ñelen	0.91
CaCO <sub>3</sub>	0.3042
Agua destilada	1
Medio de cultivo	1
Antibiótico	0.05
<b>SUB TOTAL</b>	<b>3.3317</b>
<b>MATERIALES</b>	
Bolsas de polipropileno	0.15
Grapas	0.001
papel toalla	0.06
<b>SUB TOTAL</b>	<b>0.211</b>
<b>EQUIPOS</b>	
Agitador orbital	0.35
Autoclave	0.36
Cámara de flujo laminar	0.32
Balanza	0.0375
<b>SUB TOTAL</b>	<b>1.0675</b>
<b>MANO DE OBRA</b>	
Producción de inóculo	0.75
Producción de sustrato	0.75
Inoculación	0.75
Manejo de germinación, colonización y esporulación	0.75
Cosecha y envasado	0.5
Asesoramiento de Especialista	2.5
<b>SUB TOTAL</b>	<b>6</b>
<b>SERVICIOS</b>	
Energía Eléctrica	0.9
Agua	0.5
<b>SUB TOTAL</b>	<b>1.4</b>
<b>TOTAL</b>	<b>12.0102</b>