

Dirección General de Educación Superior Tecnológica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA



CARACTERIZACIÓN Y VIABILIDAD DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM.

**Informe final de Residencia Profesional que presenta la C.
CASTILLO MARTÍNEZ MAYREN JANNETH**

Número de control:

09870076

Asesor Interno:

M. EN C. LAURA ISABEL SANSORES LARA

Carrera:

Ingeniería en Agronomía

Juan Sarabia, Quintana Roo
Diciembre 2013



ITZM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de INGENIERO AGRÓNOMO, Mayren Janneth Castillo Martínez; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno M en C. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el M en C. Emilio Te Góngora y el revisor el M en C. Jaime D. Sosa Madariaga, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo recepcional **titulado “Caracterización y Viabilidad del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el Laboratorio de Control Biológico del ITZM”** que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE

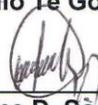
Asesor Interno


M en C. Laura Isabel Sansores Lara

Asesor Externo


M en C. Emilio Te Góngora

Revisor


M en C. Jaime D. Sosa Madariaga

Juan Sarabia, Quintana Roo, Diciembre, 2013.

Caracterización y viabilidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del ITZM

RESUMEN

Se realizó la caracterización biológica de *Beauveria bassiana*, utilizando la clave deuteromicetes de esta manera se reconocieron cada una de las estructuras que constituyen al hongo determinando así cada una por etapa de crecimiento, así mismo se realizó el conteo de esporas por medio de la cámara de Neubauer, con la que pudimos estimar su viabilidad, arriba del 80% esto quiere decir que tenemos hongos viables para ser aplicados en campo. Así mismo se realizó la cosecha de *Beauveria bassiana*, poniéndole la cantidad de 20gr de diatomita por bolsa, se colectó un total 140 gr de hongo puro.

INDICE

PORTADA.....	iii
HOJA DE FIRMAS.....	iii
RESUMEN.....	iii
INDICE.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
I INTRODUCCIÓN.....	1
II OBJETIVOS.....	3
III JUSTIFICACIÓN.....	4
IV MARCO TEORICO.....	5
V METODOLOGÍA.....	12
VI RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
VII CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	26
VIII GLOSARIO.....	27
IX BIBLIOGRAFÍA.....	28
X ANEXOS.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura No. 1.- Pesado del agar.....	12
Figura No. 2.- Esterilización en Autoclave	12
Figura No. 3 y 4.- Medio de cultivo en tubos de ensayo y cajas de Petri para después sembrar hongo <i>Beauveria bassiana</i>	13
Figura No. 5.- Esterilización directa (flama roja).....	13
Figura No. 6.- Cepa del hongo <i>Beauveria bassiana</i> donada por CESAVEQROO.....	13
Figura No. 7.- Siembra con aza en tubos de ensayo.....	14
Figura No. 8.-Siembra con aza en cajas de petri.....	14
Figura No. 9.- Sellado de cajas de Petri con cinta Parafilm.....	15
Figura No. 10.- Área de incubación.....	15
Figura No. 11.-Hongo <i>Beauveria bassiana</i> en desarrollo.....	15
Figura No. 12.- Cepas en refrigeración.....	15
Figura No. 13.- Hongo <i>Beauveria bassiana</i> en desarrollo.....	16
Figura No.14.- Autoclave marca lisa.....	16
Figura No. 15.- lavado de arroz.....	17
Figura No. 16.- embolsado de arroz.....	17
Figura No. 17.- arroz esterilizado y en el área de reposo para incubación.....	18
Figura No. 18, 19 y 20.- Inoculación de bolsas de arroz con el hongo <i>Beauveria bassiana</i> y homogenización.....	19
Figura No. 21.- Sala de maduración.....	20
Figura No. 2 y 23.- cosecha.....	21
Figura No. 24.- pesado.....	21

Figura No. 25.- refrigeración.....	21
Figura No.26.- secado.....	21
Figura No. 27.-pesado del hongo.....	22
Figura No. 28.- disolución.....	22
Figura No. 29.- viabilidad.....	23
Figura No. 30 y 31.- conteo de esporas.....	24

I INTRODUCCIÓN

Beauveria bassiana es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Es un producto biológico, su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a Insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina.

Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como Insecticida biológico o Biopesticida controlando un gran número de Parásitos de las Plantas como son las Orugas, las Termitas, las Moscas blancas, los Áfidos, los Escarabajos o los Tisanópteros.

Este control biológico se aplica a una buena variedad de cultivos de importancia agrícola como: Viandas, Granos y Hortalizas.

Los hongos entomopatógenos ocupan un lugar importante en el control microbial de insectos plaga, ya que virtualmente todos los órdenes de insectos son susceptibles a enfermedades fungosas, tomando una particular importancia el caso de insectos con aparato bucal picador chupador que no es afectado por patógenos que infectan por vía intestinal (Fonseca, 2002).

Los hongos entomopatógenos comprenden un grupo heterogéneo de más de 100 géneros, solamente un pequeño porcentaje de estos tienen que ser considerados por su potencial como agentes de control microbial; tomando en cuenta que algunos de estos géneros tienen un amplio espectro de hospederos y en muchos casos sus rangos geográficos son también amplios, contamos

entonces con una gran diversidad genética entre aislamientos de la misma especie de diferentes hospederos y localidades, por lo que es prioridad que en programas de control biológico y manejo integrado de plagas, se colecten, purifiquen y conserven estos microorganismos para obtener opción a seleccionar aquellos más promisorios para usarse en programas de control biológico por incremento (Fonseca, 2002).

Se reconocen tres requerimientos específicos para la producción comercial y uso exitoso de hongos como agentes de control de insectos. Primero el aislado del hongo seleccionado para producción masiva debe tener crecimiento rápido, abundante esporulación y patogenicidad suficientemente alta sobre la plaga blanco. Segundo, los costos de producción deben ser mínimos, esto se puede desarrollar logrando un medio que sea simple, barato, disponible en cantidades suficientes y un procedimiento de producción fácil y con un mínimo de labor. Tercero, el producto debe ser convenientemente formulado para su almacenamiento por largo tiempo bajo condiciones naturales o cercanas a estas sin pérdida significativa de su viabilidad (Fonseca, 2002).

Para ello en el presente trabajo se realizará la caracterización de *Beauveria bassiana* y su viabilidad con el propósito de obtener cepas puras para posteriormente ser utilizadas para su producción y uso como insecticidas biológicos siendo está una alternativa de control menos nociva que el uso de agroquímicos.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la caracterización y viabilidad de la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en granos de arroz en el laboratorio de control biológico en las instalaciones del ITZM.

2.2 Objetivos específicos

- Observar la caracterización del hongo *Beauveria bassiana* durante el crecimiento del hongo en medio sólido, en el laboratorio de control biológico en las instalaciones del ITZM.
- Evaluar la viabilidad del hongo *Beauveria bassiana* aplicado en granos de arroz en el laboratorio de control biológico en las instalaciones del ITZM.

III JUSTIFICACIÓN

Coadyuvar al proceso de formación que los estudiantes adquieren en el aula, así mismo les permite identificar, contextualizar e impulsar el desarrollo y la utilización de insecticida biológico o biopesticida, utilizando tecnología moderna, sin deterioro del medio ambiente y con una visión profesional.

Capacidad para identificar, plantear y resolver problemas, realizará trabajos en equipo, realizará análisis, síntesis, abstracción, adquirirá la habilidad de uso de tecnologías de información y comunicación, también aplicará los conocimientos adquiridos en la práctica.

El uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas, parece ser una alternativa viable y acorde con las tendencias actuales, donde se fomenta el aumento del uso de biopesticidas. Sin embargo la eficiencia de este método depende de un desarrollo de información básica que permita una mejor selección y caracterización de las cepas.

IV MARCO TEORICO

Aproximadamente en el año 900 A. C., se conoció en el oriente que los hongos podrían crecer en insectos (Sandoval, 2001). En 1834, Agostino Bassi considerado el padre de la patología demostró que el hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, era el agente causal de la enfermedad denominada "Muscardina blanca", causante de la muerte de larvas del gusano de la seda, *Bombix mori*.

Desde 1880 hasta principios del siglo XX espectaculares epizootias causadas por hongos entomopatógenos han conducido a estudios de su uso potencial para el control de plagas (Sandoval 2001), siendo que en el año de 1945, fue instalado el primer laboratorio de patología de insectos en la Universidad de California (Badilla, 1994).

4.1 Importancia

La protección de cultivos contra plagas de insectos aun es dominada por los plaguicidas químicos, Las ventajas de insecticidas a escala mundial en 1995 alcanzaron \$8.75 billones de dólares, de los cuales únicamente 1.5 a 2 % correspondían a biopesticidas (Alatorre, 2006). Un informe de mercado Europeo revela que la tasa de crecimiento anual es del 10.1%, con tendencia a aumentar (González-Coloma *et al.*, 2007). Debido a la continua e intensa presión selectiva se ha propiciado la aparición de plagas resistentes que requieren dosis cada vez más elevadas de insecticidas. Más de 400 plagas de insectos han

desarrollado resistencia a estos productos y además, aparece en un número aun mayor después de cada tratamiento, debido a que también son eliminados sus enemigos naturales, así como los de plagas secundarias, que al quedar fuera de control pueden rebasar el umbral económico y producir pérdidas considerables (Mier *et al.*, 1994). Todo esto han asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas incluyendo los hongos entomopatógenos (Alatorre, 2006). El mercado principal de los bioplaguicidas lo constituye la agricultura ecológica, cultivos bajo plástico, parque y jardines. (González-Coloma *et al.*, 2007). Los productos formulados con hongos entomopatógenos, constituyen solo una pequeña fracción de los biopesticidas.

4.2 Taxonomía

Según la clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973), la cual separa los hongos en dos divisiones: Myxomycota por formar plasmodios y Eumycota por no formarlos y ser frecuentemente miceliales. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota, y en las subdivisiones: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina. (Alean, 2003; Tamez *et al.*, 2007)

Los Deuteromycotina, mejor conocidos como hongos imperfectos por no presentar estado sexual, presentan la clase Hyphomycetes la cual se caracteriza por formar micelio septado con un conidióforo simple o agrupado y la identificación de los géneros se basa en la forma en que se originan las

conidias en el conidióforo (Berlanga, y Hernández, 1996b), estos hongos son los entomopatógenos más importantes ya que incluye a la mayoría de las especies conocidas como patógenos de insectos e incluyen a los de géneros considerados como promisorios en el control microbiano por incremento (Berlanga, 2004).

La clasificación de los hongos entomopatógenos es paralela al sistema establecido para hongos en general, por lo que el criterio taxonómico utilizado para su clasificación es fundamentalmente basado en sus características morfológicas, sin embargo recientemente se han considerado algunos aspectos fisiológicos, bioquímicos, y genéticos por la necesidad que ha surgido de realizar caracterizaciones más precisas entre aislamientos de la misma especie (Berlanga, 2004).

Subdivisión.- Deuteromycotia

Clase.- Coelomyces Micelia-Steril

Orden.- Sphaeropsidales

Género.- Beauveria

4.3 Biología

En 1834 Agostino Bassi demostró por primera vez que una enfermedad en insectos era ocasionada por un hongo; de manera experimental confirmó la enfermedad “muscardina blanca” del gusano de seda *Bombix mori Linnaeus*, que en 1835 Balsamo Crivell describió y llamo al hongo *Botrytis bassiana* en honor a Bassi.

El género *Beauveria* es un entomopatógeno imperfecto de la clase de los Deuteromycetes, familia Monilaceae. Es un hongo cosmopolita que infecta a más de 700 especies de insectos, (Berlanga y Hernández, 1999b).

Es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas (Godoy *et al.*, 2007).

Sus hifas septadas contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre los cuales se desarrollan las conidias. Este ramifica sus micelios para formar conidióforos que son simples e irregulares los cuales terminan en vértice en forma de racimos, la base de la célula conidiógena es globosa presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, los cuales son de $2 - 3 \times 2.0 - 2.0 \mu\text{m}$ estos se insertan sobre esterigmas curvados en forma irregular o dispuestos en zig-zag. El hongo se caracteriza por presentar una apariencia polvosa, blanco algodonoso o amarillamiento cremoso (Berlanga y Hernández, 1999b) Los hospederos de este género son principalmente lepidópteros, Coleopteros, e Hymenopteros pero puede presentarse en Homópteros y Dípteros (Berlanga y Hernández, 1996b).

4.4 Ciclo de Vida

Un insecticida microbial debe ser producido formulado y estabilizado para que bajo condiciones normales de almacenamiento no se afecten sus propiedades de insecticida. En general son al menos 18 meses de estabilidad en

almacenamientos lo requerido para el uso en el mercado agrícola. Si el insecticida es producido por contrato para aplicar en un tiempo específico una estabilidad de 3 a 6 meses puede ser aceptable. Temperatura y humedad relativa son vitales para la estabilidad, muchos entomopatogenos no permanecen estables más de 12 meses a 4°C.

4.5 Reproducción y Crecimiento

Un medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en esta ocasión deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos como lo es carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc. y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.

Se puede añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras.

4.6 Humedad

El nivel de humedad en la fermentación solida (FMS) puede variar de 12% a 80%, en la práctica los procesos se llevan a cabo en valores de humedad que varían de 40% a 80% dependiendo de la capacidad de retención de agua del material.

El contenido de líquido de las partículas debe de estar en el nivel correspondiente a la actividad de agua necesaria para el metabolismo y adecuado crecimiento del microorganismo, pero no exceder la máxima capacidad de retención de agua de la matriz sólida. El amplio rango de sustratos sólidos utilizados en la FMS se clasifican en dos grandes categorías

- 1) Las partículas son al mismo tiempo el soporte y el sustrato, este es el caso de los materiales orgánicos;
- 2) la parte solida solo es el soporte (minerales o materiales sintéticos) y deben ser humedecidos con diferentes soluciones nutritivas para el desarrollo del microorganismo.

4.7 Temperatura y Ph

La temperatura óptima para su buena reproducción es entre 25 y 27 °C, el pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8).

4.8 Medio de Cultivo

a) Papa dextrosa agar (PDA)

- Papa sin pelar 200 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1 litro

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

b) Sabouraud

- Dextrosa 20 g
- Peptona 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1000 ml

Se pueden utilizar antibióticos como Penicilina + Estreptomicina (30 – 50ppm) que deben agregarse a los medios de cultivo después de ser esterilizados en autoclave y enfriarlos a una temperatura menor a 60 °C

V METODOLOGÍA

5.1 Preparación de Matrices

La preparación de medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) se realiza en 400 ml. de agua destilada con 26 gr. de PDA en un matraz de 1L (figura No. 1), se cocina en un DIRT (Parrilla Digital) a una temperatura de 250°C durante 15 minutos. Se vertió 10 ml de Agar en 20 tubos de ensayo y 20 ml en 10 cajas Petri, los tubos de ensayo se colocan en unos vasos precipitados y las cajas de Petri se colocan en bolsas de polipapel resistentes al calor y se colocan en unas canastas metálicas que se introducen en el auto clave para ser esterilizados (figura No. 2). Después del tiempo transcurrido de la esterilización se sacan y se dejan enfriar cuando la solución ya está solidificada de forma horizontal con una leve inclinación para después continuar con la siembra de hongo *Beauveria bassiana* en los tubos de ensayo y cajas de Petri (matrices) (figura No. 3 y 4).



Figura No. 1 .- pesado del agar

Figura No. 2.- esterilización en autoclave

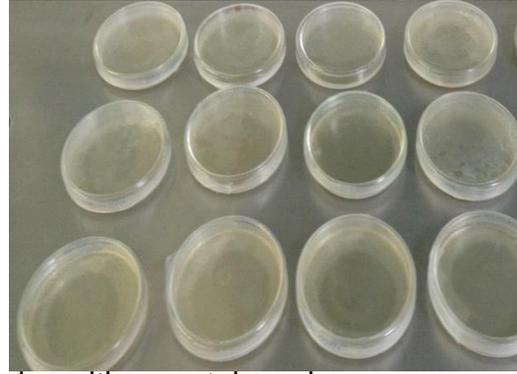


Figura No. 3 y Figura No. 4.- medio de cultivo en tubos de ensayo y cajas de Petri para después sembrar hongo *Beauveria bassiana*

5.2 Sembrado de Matrices

Se limpia y esteriliza el lugar donde se realizará la siembra, así como la cámara de flujo laminar con abundante cloro al 5% y alcohol absoluto, para una mejor esterilización se utilizó una torunda de algodón con alcohol encendido (figura No. 5). Se prepararon los mecheros con alcohol y se encienden para mantener un ambiente más estéril. Se tomó la cepa del hongo *Beauveria bassiana*, donada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEQROO) (Figura No 6).



Figura No. 5.- esterilización con fuego



Figura No. 6.- Cepa del hongo *Beauveria bassiana* donada por el CESAVEQROO.

Se realiza la siembra en los tubos de ensayo y en las cajas de Petri, se colocan los mecheros encendidos para que no se tenga mucha contaminación del medio ambiente y un tubo con agua esterilizada y antibiótico para evitar que el aza se contamine, se introduce el aza en la *Beauveria bassiana* aislada e inmediatamente se introduce al tubo de ensayo (Figura No. 7) después en la caja de petri en forma de zigzag se deposita en el medio de cultivo, se retira el aza y se introduce en el antibiótico para que no quede expuesta al medio ambiente (Figura No. 8), inmediatamente se le pone su tapón al tubo de ensayo y a la caja de Petri se sella con cinta parafilm (Figura No. 09), se colocan en un área de incubación con la luz y la temperatura adecuada para su pronta reproducción (Figura No. 10).



Figura No.7 siembra con aza en tubos de ensayo con hongo *B.b.*

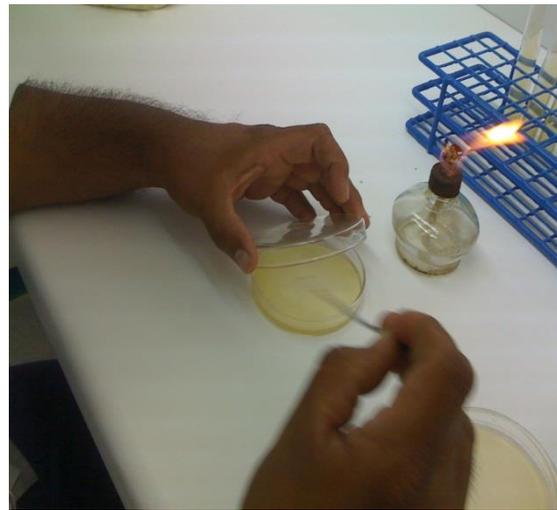


Figura No. 8 siembra con aza en cajas de Petri con hongo *B. bassiana*.



Figura No. 9 sellado de cajas de Petri con cinta parafilm.



Figura No. 10 área de incubación

Pasadas de tres semanas obtenemos las nuevas sepas de *Beauveria bassiana* producidas en el laboratorio entomológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya (Figura No. 11). Se observa muy buena esporulación y su desprendimiento como talco al agitarla ligeramente. Se llevan al refrigerador para conservar su viabilidad y utilizarlas posteriormente para inocular el arroz para su producción masiva (Figura No. 12).



Figura No. 11 hongo Beauveria b. en desarrollo.



Figura No. 12 cepas en refrigeración.

5.3 Caracterización de *Beauveria bassiana*

Se caracterizó por presentar un crecimiento lento, circular, llegando alcanzar 20 mm de diámetro en 10 días, lo que coincide con lo establecido por Domsch et al, (1993) para la colonia de *Beauveria bassiana* en un rango de 0.6 a 2.3 cm de diámetro. El aspecto de la colonia es lanoso y en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana.

Esta especie posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fialides se encuentran hinchadas en la base que asemeja la estructura de un frasco sub-globoso y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag. El tamaño de las células conidiógenas es de 3.8-7 x 1.3-1.8 μm , el raquis de 2.2-4.2 x 1 μm . Los conidios de *Beauveria bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2-3 μm de diámetro, estos resultados coincidieron con la descripción hecha por Alean (2003) y Domsch et al, (1993), para la especie *Beauveria bassiana*. (Figura No. 13 y 14).



Figura No. 13



Figura No. 14

5.4 Siembra de hongo *Beauveria bassiana* en arroz.

5.5 Preparado de Arroz

Se preparó 10 litros de agua destilada con 5ml de antibiótico (enrofloxacina al 10%) y 2.5 ml. de cloro para lavar el arroz el cual se inoculará con el hongo *Beauveria Bassiana*, se coloca el arroz dentro de una malla cernidor y se introduce dentro de una tina de plástico con el agua ya preparada se agita para lavarle el almidón y se deja escurrir durante 12-15 minutos (Figura No. 15). Seguidamente se pone 200 gr de arroz por bolsa y se amarran con muy poco aire; para luego esterilizarlas en el autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121°C, después del tiempo transcurrido y de que el autoclave se halla despresurizado, se retira el arroz el cual cuenta de un 4% a 6% de humedad y enseguida se lleva en una mesa de metal cubierta de papel estroza y ahí se depositan para que alcance una temperatura ambiente y después inocularlas con el hongo *Beauveria bassiana* (Figura No 16).



Figura No. 15 lavado de arroz



Figura No. 16 embolsado de arroz



Figura No. 17 arroz esterilizado y en el área de reposo para incubación

5.6 Inoculación de las bolsas con arroz

Se preparó en un matraz de 1000 ml; 400ml de agua con 0.5 ml de antibiótico y 0.01ml de dispersante, posteriormente se tomaron 20ml para colocarlos en dos tubos de ensayo, 10 ml para cada uno, de dicha solución posteriormente se le puso un tapón de algodón y se cubrió con papel aluminio y cinta masckin tape, Después se preparó las mangueras y el tapón del matraz y todo se puso a esterilizar en el autoclave (felissa) para su uso posterior. Después de la esterilización y de que el material tomo una temperatura ambiente; se llevó al área de siembra previamente esterilizada con cloro, alcohol y fuego; ya en la campana de flujo laminar y esterilizado y frío el material, se procedió con la homogenización de una matriz de hongo *Beauveria bassiana* con clave (BTJS-181113 JMLV), con 10 ml del agua con antibiótico y dispersante anteriormente esterilizada, de forma constante la entrada del tubo se pasa por el fuego del mechero para evitar la contaminación interna del mismo, para esto se vierte el agua de uno de los tubos (10ml) en la matriz, y después de lograr la

homogenización se deposita en el matraz con el resto del agua, se colocó la manguera a la pistola, previamente esterilizada para luego inyectar las bolsas, con un total de 20 ml para cada bolsa (2 inyecciones), inmediatamente se sella el orificio de entrada con cinta adhesiva, y se mueven las bolsas para distribuir homogéneamente el inóculo y tenga un buen desarrollo el hongo *Beauveria bassiana*, (Figuras No. 19, 20 y 21).



Figura No. 18



Figura No. 19



Figura No. 20

Inoculación de bolsas de arroz con el hongo *Beauveria bassiana* y homogenización

5.7 Traslado a sala de maduración.

La sala de maduración deberá de tener un fotoperiodo de 14 horas luz, con temperaturas promedio de 27 ± 2 °C Las bolsas se colocan en anaqueles en línea y será removido el arroz cada 96 horas para romper el micelio en para romper las estructuras de micelio en los primeros 12 días de la siembra y con ello obtener la mayor cantidad de esporas libres. El tiempo requerido para tener una máxima cantidad de esporas es de 15 a 20 días del hongo *Beauveria bassiana* en producción (Figura No. 21)



Figura No. 21 Sala de maduración

5.8 Cosecha del Hongo *Beauveria bassiana*

Esta actividad se realiza en una tina de plástico con una malla-cernidor; poniendo una bolsa de 200gr. de arroz con hongo *Beauveria bassiana* con 20 gr de diatomita siendo esta un antihumectante (Figura No. 23 y 24); después de cosechar todo el hongo se pesa (Figura No. 25), se deposita en una charola de

papel y se extiende para que seque (Figura No. 27), posteriormente se embolsa el arroz se guarda en el refrigerador (Figura No. 26).



Figura No. 22 Cosecha



Figura No. 23 Cosecha



Figura No. 24 Pesado



Figura No. 25 Refrigeración



Figura No. 26 Secado

5.9 Viabilidad

5.10 Preparación de suspensión

Se pesó 1 gramo de hongo *Beauveria bassiana*, se realizó una suspensión 1:10000 de agua más dispersante (Tween), es decir, se disolvió el hongo en 1000 ml de agua más Tween, y se mezcla se usa una cámara de Neubauer (hemacitómetro) para el conteo de esporas. (Figura 27 y 28).



Figura No. 27 pesado de hongo



Figura No. 28 disolución

5.11 Llenado de la cámara.

Se tomó una muestra del hongo diluido, colocándolo cuidadosamente en la cámara de Neubauer, en ambos lados, para colocar la muestra se deben utilizar los canales, para evitar la formación de burbujas.



Figura No. 29 viabilidad

5.12 conteo de esporas

Hay 25 celdas divididas por líneas triples que facilitan el conteo, se utilizaron 5 celdas por área, las cuatro de las esquinas y la del centro, en total se cuentan el número total de 10 celdas, cinco del área inferior y cinco del área superior. Debido a que se cuentan el número de esporas contenido en un volumen de agua, es necesario seguir un criterio uniforme, así que se inició el conteo por la parte inferior izquierda y se considera que las que las esporas que estén tocando estén tocando la línea de la parte inferior o en la parte exterior por el lado izquierdo se consideraran en el conteo, en cambio aún y cuando la espora este por dentro pero en la parte superior o en el lado derecho no se consideran en el conteo (Hernández *et al.*, 2004).

Se cuentan las esporas con la ayuda de un microscopio con el objetivo 40X, 400 conidios germinados y no germinados. Se cuenta un total de 3 cajas para estimar la viabilidad de un lote de producción. (Figura No. 30 y 31)

Calcular el porcentaje de germinación con la siguiente fórmula:

$$a/(a+b) \times 100 = \% \text{ germinación.}$$

Donde:

a= conidios germinados

b= Conidios no germinados

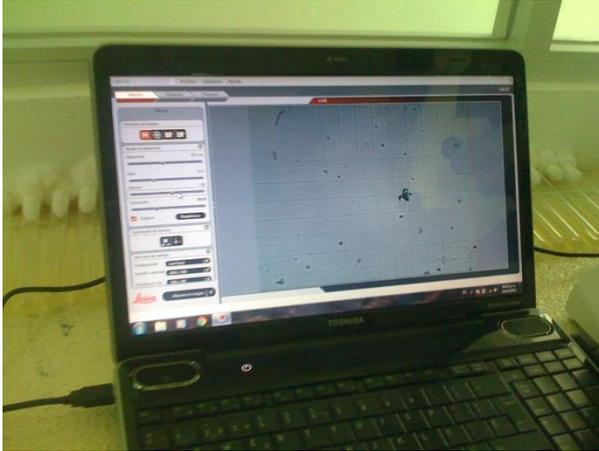


Figura No. 30 conteo de esporas

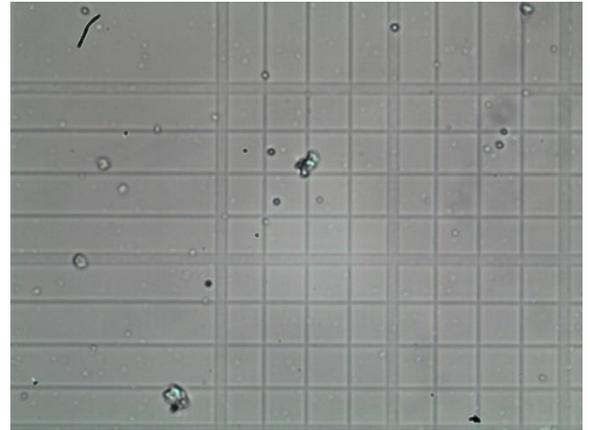


Figura No. 31 conteo de esporas

VI RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, en la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* han sido buenos por la asepsia que se ha tenido, se ha reducido a casi un 90% la contaminación, de esta manera se ha logrado producir cepas sanas en las matrices que se sembraron con aza, tubos de ensayo y cajas de Petri en la siembra en las bolsas de arroz para la producción masiva de las esporas del hongo *Beauveria bassiana* la contaminación bajo también en un 90% siendo un buen porcentaje de cepas sanas y con buena viabilidad con un porcentaje de germinación superior al 88%.

En comparación con el hongo *Metarhizium anisopliae* es un poco más lento en su crecimiento el hongo *Beauveria bassiana* y la cantidad que resulta de la misma cantidad de bolsas (30) es menor, pero son muy eficaces los dos en el combate a plagas.

Con estos resultados se puede demostrar que en el Instituto también se puede llevar acabo la producción masiva del hongo *Beauveria bassiana*, a un bajo costo, y poder ser aplicado en los cultivos cercanos al Instituto para poder también recolectar insectos micosados con este hongo y mejorar la viabilidad del hongo, el uso de este bioinsecticidad no es perjudicial al medio ambiente y evita varias plagas que atacan a los cultivos de esta región.

VII CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Las cepas de *Beauveria bassiana*, resguardadas en el laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, las cuales fueron obtenidas con el propósito de probar su efectividad como biocontroladores de plagas como lo son los mosquitos vectores del dengue *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, Mosquita Blanca (*Bemisia tabaci*) entre otros más.

El uso de las especies *Beauveria bassiana* como entomopatógenos puede ser una alternativa del control de plagas, sin embargo se debe considerar que previo a la utilización de los hongos se deben realizar algunas pruebas de patogenicidad que garanticen la efectividad de las cepas y se debe tener presente que la especificidad juega un papel importante en su aplicación, al igual que las condiciones ambientales que prevalezcan en la zona.

Así mismo, se realizó el conteo de esporas por medio de la cámara de Neubauer, con la que pudimos estimar su viabilidad arriba del 80%, tenemos que son hongos viables para ser aplicados en campo.

VIII GLOSARIO

CONIDIO.- (Conidium pl. Conidia) también se le llama conidiospora; espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos, pero nunca de producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio, como sucede con las esporangiosporas. Los conidios son las estructuras asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes y se pueden generar de novo (la mayoría) a partir de células hifales preexistentes.

ESPORA.- pequeña unidad de propagación unicelular o pluricelular asexual o sexual móvil o inmóvil que funciona como una semilla aunque difiere de esta última porque una espora no contiene embrión preformado.

HIFA.- filamento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos puede ser septado o cenocítico

HONGO.- organismo eucariótico acrorófilo, heterotrófico, y casi siempre el productor de esporas su talo varia de ameboide o plasmodial a unicelular o filamentoso

IX BIBLIOGRAFÍA

Alatorre, R. 2006. Hongos entomopatógenos como insecticidas microbianos en: XVII Curso Nacional de Control Biológico, Manzanillo Colima, ISBN: 968-5384-02-9 pp. 83-97.

Alatorre R, 2007. Hongos Entomopatógenos, en: Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Rodríguez-del-Bosque, L. A. y H. C. Arredondo-Bernal (eds.) México. 303 p.

Alean, C. 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, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria Bogotá, D. C. Colombia 101p.

Badilla, F. 1994. Utilización de hongos entomopatógenos en el control de insectos Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) 10p.

Berlanga, A. 2004. Reconocimiento de Hongos Entomopatógenos, En: Taller de de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación, Tecomán Colima, pp.29-38

Berlanga A. y V. Hernández, (Ed.). 1999b. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial, En: Ficha técnica CB-03, SAGARPA, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Berlanga A. y V. Hernández, 1996 a. Los hongos entomopatógenos en el control biológico de mosquita blanca. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico DGSV-SAGDR. Evento de aprobación y actualización fitosanitaria en la campaña contra mosquita blanca. p. 204-016.

Berlanga y Hernández, 1996 b, Identificación y Producción masiva de Hongos Entomopatógenos de Mosquita Blanca. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico DGSV-SAGDR. Memorias de aprobación y actualización fitosanitaria en la campaña contra Mosquita Blanca p 217-226.

Bustillo A. y Patricia Marín. 2002. ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana*? Manejo integrado de Plagas (Costa Rica). CATIE. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe, Caldas, Colombia. No. 63 p.i-iv, Hoja técnica No. 40

Cañedo V. y T. Ames, 2004. Manual de laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima Perú Centro Internacional de la Papa (CIP) 62p ISBN 92-9060-238-4.

Cibrian, T. 1998. Manejo Integrado de plagas y control biológico. Antología, Subsecretaria de educación e investigación tecnológicas, Dirección general de educación tecnológica agropecuaria. P.111-116.

Elosegui, C. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Habana Cuba. 43 p.

González-Coloma A., M. Reina, B.M. Fraga, C.E. Díaz y R. Cabrera, 2007, Bioplaguicidas Naturales para la protección de cultivos, En: Bioplaguicidas y control biológico: Biocompuestos con actividad antimicrobial, Centro de Investigaciones en Química aplicada, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2:30-41

Godoy, J.C. R.E. Valera, C. Guédez, L.M. Cañizalez y C. Castillo, 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico "Dr Carlos Diaz Polanco", Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Universidad de los Andes. Rev. Fac. Agron. (LUZ).24: 415-425

Guerrero C, Jaime, Carrillo LL., Roberto y Aguilera P., Alfonso. 1999. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, asociado a larvas de

escarabaeidos y curculionidos. *Agro sur*, jul. 1999, vol.27, no.2, p.23-34. issn 0304-8802.

Hernández, V. A. Berlanga Y M. Carillo, 2004. Formulación y Parámetros de Calidad de Hongos Entomopatógenos, en: Taller de calidad de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación, Tecomán Colima, pp. 13-28

Hernández V. y A. Berlanga, 2007. Formulación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae var. Acridum*, Taller sobre control biológico y manejo de la langosta Centro Americana (*Schistocerca piceifrons*, Walker) ISBN 978-968-5384-09-4 p. 127-137

Hernandez, V. y A. Berlanga, 2004. Tamaño de partícula y Contenido de Humedad en Formulación de Hongos Entomopatogenos, en: Taller de Calidad de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Pp.53-58.

Hernández-Mendez, J. Esteban Barranco-Florido, Alejandro Azaola-Espinoza, 2007, Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* Y *Lecanicillium lecanii* (Moniliales: Moniliaceae) por su esporulación en cultivo sólido y su crecimiento en cutícula de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: pyrgomorphidae), en: XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán. Pp.136-140.

Lecuona, E. R. 2002. Situación actual y perspectivas de uso de bioplaguicidas en Latino América. In: Manual del curso Internacional de producción y uso de agentes microbianos para el control de plagas en la agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. p. 9-16.

Lezama R y J. Molina-Ochoa. 2004. Monitoreo de Virulencia en formulados de Hongos entomopatógenos, en: Taller de Calidad de Agentes de Control Biológico, Secretaria de Agricultura Ganaderia, Desarrollo Rural y Pesca y Alimentación, Tecomán Colima, pp.39-52

Lira, S. 2007. Bioplaguicidas y su control biológico. Centro de Investigaciones de química aplicada, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. P. 231 ISBN: 968-844-054-X

López –Lorca and H.-Börjes. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematofagos: Centro iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO) Universidad de Alicante. 6:12-15.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de Hongos entomopatógenos en Nicaragua, Avances en el fomento de Productos Fitosanitarios No- Síntéticos, Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p.95-103.

MaCoy, y Samson, 1988. Entomogenous fungi. In: CRN Handbook of natural pesticides. Volume V Microbial insecticides Part A entomogenous, protozoa and fungi. C.M. Ignoffo (ed.) CRP Press, Inc. Boca Raton, FL. P. 151-236.

Mier, T. J. Castellanos, K. García, M. Ayala *et al.*, 2004. Valoración de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. Sociedades Rurales, Producción y Medio ambiente. Vol. 5 8: 57-67

Ortiz- Catón M. y R. Alatorre- Rosas 1996 Factores que influyen sobre el impacto de los hongos entomopatógenos en el control de la mosquita blanca. Simposio Control biológico mosquita blanca. XIX Congreso Nacional de Control Biológico. Culiacán Sin. Nov. 1996. 34-39

Pucheta, D., A. Flores Macias, S. Rodríguez Navarro y M. de la Torre. 2000. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI*, dic. 2006, Asociación Inter Ciencia Venezuela, vol.31, no.12, p.856-860. ISSN 0378-1844.

Tanzini, M.R., S. Batista, A. Setten, N. Toschi, 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 59 p. 15 - 18.

Van, Driesche 2007. Hongos como bioplaguicidas, Control de plagas y Malezas por enemigos naturales, SECO9 24: 447-452

Vara, E. Jhony Navat, Keiko Shirai-Matsumoto, Raquel Alatorre-Rosas, 2007. Producción de esporas, quitinasas, proteasas y n-acetil- β -hexosaminidasas de *Lecanicillium lecanii* (atcc 26854) en fermentación bifásica con adición de quitina de camarón. XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán, pp.9-13

Vergara, R. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779

Páginas de la web.

Herrera, J. Welcome to Herrera's Microfungi Home Page. [en línea] División of Science. Truman State University. Kirksville. Abr 2001. [citado marzo, 2003].

<http://www2.truman.edu/~jherrera/Anamorphic_fungi/genera.html>

Malloch, D. Moulds: Isolation, cultivation, identification. [en línea] Department of Botany, University of Toronto. 1997 [citado marzo, 2003].

<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>

Meteos, G. 2009. Mantenimiento y conservación de microorganismos industriales <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html>

Moschetti, R. 2003. Technical Bulletin: GREENHOUSE MANAGEMENT SERIES, The Problem: APHIDS.

<http://www.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/Hort/screens/The%20Problem%20Aphids.htm>

X ANEXOS

10.1 Dilución seriada:

Consiste en colocar el insecto esporulado en un recipiente con agua destilada estéril y dispersante, la suspensión resultante se debe agitar por 1 min, como resultado se obtiene una suspensión concentrada del inóculo y otras partículas; esta suspensión es la solución madre. A partir de esta solución se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). La primera dilución (10^{-1}) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril mas 0,01 % de Tween 80, éste se agita fuertemente durante 1 min. Luego se coloca 1ml de esta suspensión en otro tubo de ensayo con 9ml de agua destilada estéril mas 0,01 % de Tween 80, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr una serie de diluciones (10^{-1} hasta 10^{-6}). Para realizar la siembra y obtener los cultivos del hongo se deben usar las últimas diluciones.

10.2 Preparación de medio de cultivo

a) Papa dextrosa agar (PDA)

- Papa sin pelar 200 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1 litro

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

b) Sabouraud

- Dextrosa 20 g
- Peptona 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1000 ml

Se pueden utilizar antibióticos como Penicilina + Estreptomicina (30 – 50ppm) que deben agregarse a los medios de cultivo después de ser esterilizados en autoclave y enfriarlos a una temperatura menor a 60 °C

10.3 Técnica de conservación por sílica gel.

1. Esterilizar en autoclave los tubos de vidrio con tapa rosca de 4 ml de capacidad, con la respectiva identificación incluida dentro del tubo.

2. Colocar sílica gel (6 – 22 mesh, sin indicador) en tres cuartas partes del tubo de vidrio y esterilizar con aire caliente en un horno a 180 °C durante 3 horas.
3. Mantener los tubos en congelación hasta su uso.
4. A un tubo de vidrio conteniendo medio PDA y el hongo en crecimiento, agregar 3 ml de agua destilada estéril.
5. Con la ayuda de un ansa de siembra, retirar todo el desarrollo miceliano del hongo y luego agitarlo en el vortex durante 15 segundos.
6. En una cámara de flujo laminar, utilizando una micropipeta, agregar 500 µl de la suspensión de conidias al tubo con sílica gel, previamente identificado.
7. Poner los tubos con inóculo y sellados con parafilm® en una incubadora a 20 °C por 15 días.
8. Luego de ese lapso, colocar los tubos a 4 °C por el tiempo que se quiera almacenar.

Para la reactivación de los hongos:

1. Tomar unos cuantos cristales de sílica gel, en un ambiente estéril y colocarlos sobre medio de cultivo.
2. Sellar la placa, colocarla a 20 °C y esperar su desarrollo

10.4 Técnica de liofilización

El proceso es el siguiente:

1. Esterilizar en autoclave tubos con tapa rosca, previamente identificados y con 0.25 cm² de algodón.
2. Al tubo con el medio de cultivo y colonia, agregar 2 ml de una suspensión crioprotectora a base de glucosa y gelatina.

Preparación:

Un litro de agua destilada con 6 gramos de glucosa.

Un litro de agua destilada con 6 gramos de agar.

Se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.

3. Añadir al tubo 1 ml de cada preparación.
4. Con un ansa de siembra separar el cultivo del medio.
5. Añadir 200 µl de la suspensión de hongos en el tubo estéril.
6. Cerrar los tubos y llevarlos a - 80 °C de 10 a 15 minutos y luego liofilizarlos por 48 horas.
7. Retirar los tubos del liofilizador, cerrarlos bien y sellarlos con Parafilm y mantenerlos a 4 °C.

Para la reactivación de los hongos:

1. Abrir el tubo, bajo un ambiente estéril, añadir 1 ml de agua estéril y dejar reposar durante 30 minutos (rehidratación).

2. Tomar una pequeña cantidad de la suspensión y sembrarla en placas de petri con medio de cultivo.

Es conveniente realizar la reactivación de la cepa almacenada antes de empezar a trabajar con cualquier método, pasándola por un insecto hospedante con la finalidad de comprobar su viabilidad y pureza.