

**COMPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO PARA LOS  
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*  
y *Paecilomyces lilacinus***

**ERNEY YAMID OSPINA RÍOS  
CC. 8 355 414**

**POLITÉCNICO COLOMBIANO “JAIME ISAZA CADAVID”  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
INGENIERÍA AGROPECUARIA  
MEDELLÍN  
2010**

**COMPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO PARA LOS  
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*  
y *Paecilomyces lilacinus***

**ERNEY YAMID OSPINA RÍOS**

**Informe de Práctica Profesional presentado como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agropecuario**

**Asesor Técnico  
ELKIN DARIO LÓPEZ ARISMENDY  
MSc. Biotecnología**

**POLITÉCNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
INGENIERÍA AGROPECUARIA  
MEDELLÍN  
2010**

***Para mis padres Graciela y Libardo, mis hermanas Feniber y Yadira y las demás personas que aprecio, porque sin ellos no habría esencia de mí ser para sobrevivir.***

**ERNEY YAMID OSPINA RÍOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa un gran agradecimiento a:

Elkin López A. MSc. Biotecnología, Asesor Técnico.

Jorge Palacio M. MSc. En Educación y Desarrollo Humano, Asesor Metodológico.

Tatiana Cardona. Docente del Politécnico “Jaime Isaza Cadavid”

Lina Cataño. Bacterióloga. Institución Universitaria “Colegio Mayor de Antioquia”

Yesíd Alejandro Ochoa. Ingeniero en Instrumentación y Control

John Jairo Ospina Carmona. Gerente General Microminerales

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1. REVISIÓN DE LITERATURA	17
1.1 IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS	17
1.2 HONGOS PATÓGENOS DE INSECTOS USADOS PARA CONTROL BIOLÓGICO	17
1.2.1 Características generales	17
1.2.2 historia	18
1.2.3 Taxonomía	20
1.2.4 Características de la acción de los hongos patógenos de insectos	26
1.2.5 Propiedades más importantes de los hongos entomopatógenos	28
1.2.6 Reproducción de los hongos entomopatógenos	29
1.2.7 Control de insectos plagas con hongos entomopatógenos	30
1.2.8 Perspectivas en el uso de hongos entomopatógenos	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 LOCALIZACIÓN	33
2.2 MATERIALES Y EQUIPOS	33
2.3 MÉTODOS	34
2.3.1 Cepas de los hongos entomopatógenos	34
2.3.2 Preparación de los medios de cultivo líquidos	34
2.3.3 Preparación de los medios de cultivo sólidos en arroz	35
2.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
2.4.1 Pruebas de evaluación de los cultivos de hongos	37

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	39
3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS CULTIVADOS OBSERVADOS AL MICROSCOPIO	42
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
CIBERGRAFÍA	50
ANEXOS	48

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ingredientes de los medios de cultivo líquidos utilizados para la obtención de micelio	36
Tabla 2. Resultados de concentración y viabilidad de conidias de <i>M. anisopliae</i> , <i>P. lilacinus</i> y <i>B. bassiana</i> cultivados en distintos medios	39

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Apariencia del rayado de la cámara de Neubauer	37
Figura 2. Bandeja con <i>M. anisopliae</i> cultivado en medio 1	40
Figura 3. Bandeja con <i>B. bassiana</i> cultivado en medio 3	41
Figura 4. Bandejas con esporulación de hongos en medio 4	42

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Principales características de los patógenos de insectos	49
Anexo B. Especies de hongos entomopatógenos que se observan con Frecuencia en el ecosistema cafetero Colombiano	50
Anexo C. Penetración del hongo en el insecto	51
Anexo D. Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos	52
Anexo E. Parásitos fungales necrótrofos y biótrofos que atacan insectos	53
Anexo F. Cultivos en Colombia donde se utilizan comercialmente los hongos entomopatógenos	54
Anexo G. Productos comerciales de <i>Beauveria bassiana</i> registrados ante el ICA	54
Anexo H. Cepa de <i>Beauveria bassiana</i>	55
Anexo I. Cepa de <i>Metarhizium anisopliae</i>	55
Anexo J. Cepa de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	56
Anexo K. Cepas en incubación	56
Anexo L. Manipulación de hongos biocontroladores en el laboratorio	57
Anexo M. Cultivos de hongos biocontroladores en fase líquida	57
Anexo N. Agitador orbital para cultivo de hongos biocontroladores en fase líquida	58
Anexo O. Bolsas de polietileno con un cultivo de <i>B. bassiana</i> utilizando arroz como sustrato	58
Anexo P. Procedimiento de diluciones seriadas para manejo de las cepas en el laboratorio	59

Anexo Q. Resultados de análisis estadístico para el parámetro concentración 59

Anexo R. Resultados de análisis estadístico para el parámetro germinación 61

## GLOSARIO

**Alícuota:** es el volumen o cantidad de masa que se va a emplear en una prueba de plataforma o de laboratorio.

**Apresorio:** estructura adhesiva, a partir de la cual se origina una hifa afilada que rompe la cutícula de una célula epidérmica del huésped.

**Ascospora:** es una espora (meiospora) contenida en una asca. Esta clase de espora es específica a los hongos clasificados como Ascomycetes.

**Conidia:** es una estructura reproductiva asexual de los hongos inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.

**Conidióforo:** es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias.

**Cuerpo fructífero:** es una estructura que contiene esporas formada a partir de un plasmodio en algunas bacterias y protistas.

**Cutícula:** en los artrópodos, la cutícula es la capa más exterior del tegumento, inmediatamente por encima de la epidermis y segregada por ésta. Es una formación rígida, acelular (sin células), de estructura compleja y compuesta por quitina, entre otras sustancias.

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**Epidemia:** enfermedad que se propaga durante algún tiempo, acometiendo simultáneamente a gran número de individuos.

**Epizootia:** enfermedad que acomete a una o varias especies de plantas, por una causa general y transitoria.

**Espora:** en biología designa una célula reproductora asexual, generalmente haploide y unicelular. La mayoría de los hongos producen esporas; aquellos que no lo hacen se denominan hongos asporógenos.

**Esporangio:** es la estructura de las plantas, hongos o algas que produce y contiene las esporas.

**Fotoperiodo:** son los cambios de iluminación que recibe un hongo u otro individuo.

**Hemolinfa:** se denomina hemolinfa al líquido circulatorio de los artrópodos. Análogo a la sangre de los vertebrados.

**Hifa:** son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio.

**ICA:** Instituto Colombiano Agropecuario.

**Micelio:** es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Los micelios vegetativos se encargan de la absorción de nutrientes.

**rDNA:** molécula derivada de DNA

**RNA:** Ácido ribonucleico

**Tegumento:** en insectos, cumple como función separar y proteger al insecto de las posibles adversidades.

## RESUMEN

Se evaluaron diferentes medios de cultivo, para realizar fermentación bifásica de hongos Ascomycetes, con el fin de obtener conidias viables que se puedan usar en control biológico de plagas agrícolas. La fermentación bifásica realizada no utiliza sustrato sólido para lograr la esporulación de los hongos. Los resultados de concentración de conidias obtenidas, se compararon con el método tradicional de cultivo de hongos en arroz. Se obtuvo una mayor concentración de esporas por medio de la fermentación bifásica en el medio 4, el cual está compuesto por harinas de soya y trigo, glucosa y carbonato de calcio, cuando se cultivaron *B. bassiana* y *P. lilacinus* con  $6,5 \times 10^{10}$  y  $7,0 \times 10^{10}$ , respectivamente. Estos resultados fueron entre 5 y 10 veces más altos que los obtenidos en cultivo en arroz de los mismos hongos, donde la concentración fue de  $1,2 \times 10^{10}$  para *B. bassiana* y de  $6,4 \times 10^9$  para *P. lilacinus*. La germinación de las conidias obtenidas en cualquiera de los dos métodos de cultivo no presentó diferencias significativas. Se recomienda cultivar y escalar el proceso de la fermentación bifásica sin sustrato sólido para hongos Ascomycetes, como *B. bassiana* y *P. lilacinus*, con el fin de obtener cantidades suficientes para ensayos de formulación y actividad en campo.

**Palabras Clave:** Fermentación bifásica, esporulación, medios de cultivo, Ascomycetes, Conidias.

## ABSTRACT

It was evaluated different culture media for biphasic fermentation of fungi Ascomycetes, in order to obtain viable conidia that can be used in biological control of agricultural pests. Biphasic Fermentation does not use solid substrate made to achieve sporulation of the fungus. The concentration of conidia results obtained was compared with the traditional method of growing mushrooms in rice. It had a higher concentration of spores by the biphasic fermentation in the medium 4, which is composed of soy and wheat flour, glucose and calcium carbonate, when grown *B. bassiana* and *P. lilacinus* with  $6.5 \times 10^{10}$  and  $7.0 \times 10^{10}$ , respectively. These results were between 5 and 10 times higher than those obtained in rice cultivation in the same mold, where the concentration was  $1.2 \times 10^{10}$  for *B. bassiana* and  $6.4 \times 10^9$  for *P. lilacinus*. Germination of conidia obtained in either culture methods showed no significant differences. It is recommended to grow and scale the two-phase fermentation process without Ascomycetes fungal solid substrate, such as *B. bassiana* and *P. lilacinus*, in order to obtain sufficient quantities for testing the development and field activity.

**Keywords:** biphasic fermentation, sporulation, culture media, Ascomycetes, Conidia.

## INTRODUCCIÓN

Los altos costos de los cultivos comerciales en nuestro país, se deben a la utilización indiscriminada e irracional de agroquímicos, total o parcialmente importados, que trasladan los posibles beneficios económicos fuera del país. Los costos ambientales producidos por agroquímicos en el control de plagas, representados en la exterminación de la fauna benéfica, la intoxicación de campesinos, eliminación de peces, aves y otras especies faunísticas, contaminación de las fuentes hídricas y alimentos como la carne vacuna, porcina, aviar y de otros animales domésticos, son costos ambientales que deben ser reducidos mediante la implementación de programas de manejo integrado de plagas en todas las regiones del país. Afortunadamente las tecnologías de producción, manejo y aplicación de productos biológicos, se ha ido desarrollando en forma acelerada con el fin de contrarrestar dichos daños (Jiménez, 2001).

Debido a la problemática que presenta nuestro planeta, el interés por los hongos entomopatógenos como una alternativa para manejar insectos plagas en los cultivos vienen en ascenso no sólo en Colombia sino en todo el mundo. Esto se ha ido propiciando por problemas de resistencia de los insectos a los insecticidas, por el interés de producir alimentos libres de residuos de productos químicos, de conservar el medio ambiente libre de contaminantes y de preservar la diversidad de especies que sufren el impacto negativo de los insecticidas. En Colombia la producción de estos hongos es aún muy artesanal y muy pocas empresas se preocupan por investigar en nuevos sistemas de producción. En este trabajo se propuso evaluar la fermentación bifásica de hongos Ascomycetes utilizados en control biológico modificándola para no usar sustratos sólidos y obtener conidias puras que puedan ser formuladas y utilizadas en cultivos de invernadero y campo.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar diferentes medios de cultivo para la obtención de conidias de hongos biocontroladores como alternativa al cultivo tradicional en arroz.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar cultivos bifásicos de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* usando diferentes ingredientes para la obtención de micelio y conidias.
- Comparar los valores de concentración de conidias en distintos medios de cultivo bifásico contra el cultivo tradicional de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* usando arroz como sustrato.
- Implementar las técnicas de evaluación de la esporulación, germinación y pureza de cultivos de hongos en el laboratorio de agrobiológicos del Politécnico Colombiano JIC en la sede Rionegro.

## 1. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1 IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS

El control biológico de insectos plagas se refiere al uso deliberado de parasitoides y predadores con el objetivo de mantener las poblaciones del insecto dañino por debajo del nivel económico. De Bach (1969), lo define en un sentido ecológico como la regulación, por medio de enemigos naturales, de la densidad de poblaciones de otro organismo a un promedio menor del que existiría en ausencia de tales enemigos.

Los patógenos de insectos son formas procariotas, es decir, organismos sin núcleo y membrana nuclear verdaderas, como las bacterias y virus, y en el caso de hongos y protozoarios constituyen formas eucariotas, organismos con un núcleo verdadero encerrado por una membrana nuclear. Los nematodos y microorganismos complejos, se incluyen dentro de los patógenos debido al gran número de especies que causan enfermedades en los insectos (Nicholls, 2008).

Han sido descritas cerca de 2000 especies de microorganismos con potencial en control microbiano de poblaciones de insectos plagas; agrícolas, forestales, ornamentales y salud Ignoffo e Hink (1971), citados por Badii (1994). Las especies se encuentran localizadas en diferentes tipos de microorganismos (Anexo A). Referente a los hongos, se incluyen alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos de unos 100 géneros (Hoyos, 2001).

### 1.2. HONGOS PATÓGENOS DE INSECTOS USADOS PARA CONTROL BIOLÓGICO

**1.2.1 Características generales:** los hongos patógenos de insectos, también llamados entomopatógenos son microorganismos parasíticos y causan enfermedad a sus huéspedes Nicholls (2008) (Anexo B). Ellos raramente son patógenos letales de vertebrados, pero sí en muchos casos son patógenos importantes de invertebrados, es decir, que son organismos capaces de causar una enfermedad en los insectos Hajek (2004), citado por Bustillo (2008); Lacey y Kaya (2007). Las enfermedades causadas por los hongos se denominan micosis.

Los hongos son organismos eucariontes, con un núcleo claramente definido por una membrana, pueden estar compuestos de una célula simple (unicelulares), como es el caso de las levaduras, o como en la mayoría de los casos, estar formado multicelularmente por unidades filamentosas conocidas como hifas, que

forman un micelio. Las hifas están formadas por segmentos uninucleados o multinucleados, separados por paredes transversales (Bustillo, 2008).

A diferencia de otros patógenos, los hongos patógenos de insectos usualmente infectan los insectos mediante una penetración activa a través de la cutícula (Anexo C), ésta característica los vuelve más atractivos como controladores de insectos. Existen reportes de invasión oral, por medio de espiráculos u otras aberturas externas en el caso de hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*; penetración por medio de acción enzimática y física como en el caso de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces farinosus*, los cuales producen proteasa y quitinasa. En el caso de tegumentos suaves, la hifa o tubo germinativo penetra directamente sin la formación de apresorios. El tubo germinativo produce un apresorio (Anexo C) y con frecuencia placas de penetración y cuerpos hifales, en el caso de cutículas gruesas, éstos con el fin de lograr buena penetración (Nicholls, 2008).

Los hongos entomopatógenos se encuentran asociados a insectos pertenecientes a diferentes órdenes. El estado inmaduro del insecto (ninfa o larva) es en general el más atacado. Su especificidad a un huésped varía, algunos tienen un amplio rango de hospederos, mientras que otros están restringidos a una especie de insecto Nicholls (2008). En el manejo de plagas, estos hongos entomopatógenos son de rápida acción, de prolongada permanencia, de fácil formulación y aplicación, como también de bajos costos Lacey y Kaya (2007). Ellos se pueden emplear bien sea al máximo en forma natural; y/o por introducción de ellos; el objetivo es que se conviertan en un factor persistente de mortalidad que por medio de aplicaciones microbiales (inundaciones) hagan un control temporal e incluso permanente del insecto Vélez (1984). La eficacia de éstos hongos contra los insectos plaga depende de factores, como, la especie o cepa específica, del hongo patógeno a usar, de la etapa de vida susceptible del hospedero, de la humedad y temperatura adecuadas, entre otros factores.

Según Jiménez (1992) los hongos entomopatógenos utilizados para el control de insectos plagas deben ser específicos, permanentes, patogénicos e inocuos al ambiente.

**1.2.2 Historia:** los primeros organismos que se identificaron como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, debido a que era posible observar su crecimiento en la cutícula de los insectos (Tanada y Kaya 1993, citados por Bustillo 2008). Louis Paster es considerado, el primer científico en proponer el uso de los hongos entomopatógenos para el control de los artrópodos plagas, pero fue E. Metchnikoff en los comienzos de los setentas del siglo XIX quien llevó a cabo la primera evaluación práctica; ya que la investigación adelantada en la interacción insecto-hongo subsecuente lo llevo a descubrimientos en la inmunidad celular humana, por lo cual él fue posteriormente galardonado con el premio Nobel de medicina.

Los registros indican que la enfermedad muscardina verde (*Metarhizium anisopliae*) fue producida masivamente y aplicada en el campo para el control de varios coleópteros plagas (*Anisoplia austriaca*) en cultivos anuales (papa, remolacha azucarera y trigo en Rusia) (Steinhaus, 1969). Otro autor, como el caso de Rodríguez (1989) corrobora con la información, él dice que los primeros trabajos sobre los hongos entomopatógenos se reportaron en Italia, en el año de 1830, a partir de estudios realizados por Agostino Bassi, sobre la enfermedad muscardina blanca del gusano de seda *Bombix mori*, causada por *Beauveria bassiana*.

Hacia finales del siglo XIX y comienzos del XX, los hongos entomopatógenos han sido activamente evaluados como agentes de control biológico de una variedad de artrópodos plagas en diversas partes del mundo: *Aschersonia* spp. contra la mosca blanca de los cítricos en Estados Unidos y el Caribe; *Lecanicillium lecanii* contra escamas del café en el lejano Este; *Beauveria bassiana* contra el barrenador del maíz en Estados Unidos; *Metarhizium anisopliae* contra la salivita de la caña de azúcar en Trinidad; y *Entomophaga grylli* contra la langosta en Sud África. Éstos estudios pioneros en control de plagas que antecedieron el uso de los insecticidas químicos por un periodo considerable de tiempo, han sido bien documentados por Samson *et al.* (1988), quienes también analizaron las razones para la falla. Entre ellas: falla en la correcta identificación del patógeno o un “patotipo” más apropiado, formulación pobre y tiempo incorrecto de aplicación; conocimiento deficiente de la dinámica de la población de la plaga; y sobre todo fallas en la interpretación de la crítica dependencia de los hongos entomopatógenos de las condiciones climáticas especialmente humedad alta. En América en 1890, se utilizó *Beauveria bassiana* para el control de *Blissus leucopterus* en el estado de Kansas. Éste evento fue de considerable importancia histórica, porque determinó la relación de los factores climáticos con los procesos de infección del hongo (Anexo D), obteniéndose éxito por los granjeros durante los dos primeros años. Posteriormente se presentó una drástica reducción de las poblaciones del chinche hasta desaparecer por completo sin intervención del hombre (Roberts y Yendol 1971, citados por Rodríguez 1989).

Según Rodríguez (1990), entre los principales hongos entomopatógenos comunes encontrados en Colombia se registran *Metarhizium* spp. en larvas y adultos de chisas de pastos, gusano blanco de la papa, picudo del plátano, palomillas y áfidos en papa y cebada; *Paecilomyces* sp. en chisas y otros cucarrones en pastos y arroz; *Beauveria* spp. en gusano blanco de la papa, chisas y larvas del taladrador de la caña de azúcar y comedores de follaje en palma africana; *Lecanicillium lecanii* en escamas, mosca blanca y áfidos en café, crisantemo y otras flores.

**1.2.3 Taxonomía:** por muchos años, la taxonomía de los hongos entomopatógenos se ha basado en sus características morfológicas, fisiológicas y de desarrollo. Estas características han determinado la estructura que se conoce actualmente de clase, género y especie. Las complejidades del ciclo de vida de los hongos dieron lugar a que muchos de ellos fueran clasificados no con base en sus características evolutivas, sino en sus funciones comunes, la ecología o en función del medio ambiente. Ello ocasionó que algunas especies se clasificaran incorrectamente en el esquema filogenético (Goettel *et al.*, 2005, citados por Bustillo 2008). La forma, morfología y dispersión de las esporas también ha sido un importante criterio de clasificación.

El estudio del DNA y RNA han permitido entender procesos evolutivos. En cuanto a los hongos entomopatógenos, en ellos se han aprovechado sus polimorfismos para diversos estudios moleculares. Las secuencias de la subunidad pequeña de rDNA, derivada de la unidad de DNA se ha usado para examinar las relaciones filogenéticas en *Metarhizium* (Driver *et al.*, 2000, citados por Bustillo 2008) y en el Orden de los Entomophthorales (Jensen *et al.*, 1998, citados por Bustillo 2008). Éste mismo tipo de secuencias (rDNA) fueron las que permitieron la reclasificación del género *Verticillium*, de tal forma que todos los hongos entomopatógenos de este grupo fueron reubicados en el género *Lecanicillium* sp. (Zare *et al.*, 2000, citados por Bustillo 2008).

Según Evans (1991), los principales grupos de hongos entomopatógenos potenciales y actualmente usados para el control biológico se encuentran en las clases Zygomycetos, Ascomycetos, y Deuteromycetos. Los autores C. Nicholls y A. Bustillo ayudan a corroborar lo dicho por Evans, Ellos también dan descripción de las principales clases de grupos de hongos entomopatógenos (Anexo E).

- **División:** según Nicholls (2008) los microorganismos que causan infección, entre ellos, los hongos entomopatógenos se pueden dividir por algunas características determinantes; los patógenos potenciales, facultativos y obligados, son una clara muestra de éstos. Los Patógenos potenciales, son microorganismos incapaces de invadir al hospedero por medio de la pared cuticular o del tracto digestivo, requieren de la ayuda del medio ambiente para que reduzcan la resistencia del hospedero o favorezcan la habilidad del microorganismo de invadir el hospedero. Con diferentes características se encuentran los Patógenos facultativos, éstos son microorganismos que no requieren de un insecto debilitado. Ellos pueden invadir el insecto o no, y su reproducción puede ocurrir en el insecto. Sin embargo, la sobrevivencia de ambos, potenciales y facultativos, no depende totalmente del insecto. Éstos son patógenos fáciles de cultivar sobre medios artificiales. Por último tenemos los Patógenos obligados, ellos requieren de un insecto vivo para sobrevivir y multiplicarse. Pueden darse fuera del insecto en estado de dormancia como esporas, quistes, inclusiones, etc. Fuera de los hongos entomopatógenos, existen otros patógenos obligados como lo son los virus, los protozoos y ciertos hongos y bacterias.

- **Clasificación:** los hongos o Mycota se agrupan en dos divisiones: Myxomycota que presentan un plasmodio o estructuras similares en su ciclo de vida y en Eumycota, que carecen de esas estructuras. Dentro de los Eumycota podemos encontrar a las subdivisiones: Mastigomycotina, Zigomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Anexo E); siendo la última subdivisión “Deuteromycotina” la de mayor importancia por su sin número de géneros empleados en el control microbiano de insectos (CMI, 1985; Samson *et al.*, 1988, Citados por Lecuona 1996). Aunque según otros autores ya no es ella la principal.

Roy *et al.*, (2006), citados por Bustillo (2008) dicen que los hongos entomopatógenos están presentes en todas las clases de hongos conocidas; pero posiblemente los más ampliamente distribuidos se encuentran en las divisiones Zigomicota y Ascomicota, hecho que los autores dan, para lograr cooperar a la expeditiva tarea de la clasificación. Ellos afirman que muchos de los Ascomicetos en el transcurso del tiempo aparentemente perdieron la habilidad de formar su estado sexual, y fue debido a ello que en algún tiempo fueron clasificados en el grupo de los Hyphomycetes, clasificación que ha sido reconsiderada; ya que aseguran que en la **División Ascomicota**, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales, Familia Clavicipitaceae, se encuentran los hongos entomopatógenos más comunes. La anterior afirmación da pie para decir que según características como lo son, el estado sexual u otras, se pueden reclasificar antiguos géneros conocidos comúnmente en la subdivisión Deuteromycotina, para la subdivisión Ascomycotina.

Dentro de los principales tipos de hongos patógenos de insectos criados en laboratorio, empleados en el control biológico y de nuestro gran interés están los pertenecientes a la subdivisión Ascomycotina. Ellos serán descritos a continuación.

**Subdivisión Ascomicotina:** los hongos de la subdivisión Ascomycotina se caracterizan por tener un micelio septado y haploide. Presentan esporas sexuales denominadas ascosporas, estructuras de resistencia las cuales se dan como el resultado de adaptaciones para la supervivencia. Las ascosporas se producen agrupadas en cuerpos fructíferos o ascos, en unas estructuras denominadas ascomas. Cada asco está formado por ocho ascosporas. Al estado sexual del ascomiceto se le conoce como teleomorfo, y el estado asexual se denomina anamorfo, en este caso se producen conidias en lugar de ascosporas. Solo unos pocos Ascomicetos producen esporas sexuales en cultivos y no hay ejemplos de uso de éstos hongos en el control biológico clásico o inundativo (Bustillo, 2008). Dentro de la división Ascomicota existen más de 40 géneros de hongos entomopatógenos controladores de insectos plagas a los que no se les conoce la forma sexual, aunque según autores existen algunas excepciones.

Algunas especies son ampliamente distribuidas y ofrecen las mayores posibilidades para ser empleadas en el control biológico de insectos. Andersch *et al.*, (1990); Papierok, (1991); Roberts *et al.*, (1991), citados por Lecuona (1996). Según Bustillo (2008), entre los géneros de nuestro interés y unos de los más importantes de ésta subdivisión, pertenecientes anteriormente a la clase Hyphomycetes y actualmente pertenecientes a la clase Sordariomycetes, orden Hypocreales podemos destacar a los hongos: *Beauveria bassiana*, con un amplio rango de hospederos, *Metarhizium anisopliae* con un rango de hospederos que incluye importantes plagas del suelo y especies de mosca blanca de gran transcendencia económica y *Paecilomyces* spp., destacado controlador de lepidópteros. Entre otros están también, *Lecanicillium lecanii*, considerado por su efectivo control de moscas blancas, áfidos y escamas, están *Aschersonia aleyrodis*, con efectivo control de moscas blancas, áfidos y escamas al igual que *L. lecanii*, *Noumorea rileyi*, importante controlador de *Anticarsia gemmantalis* (lepidópteros) e *Hirsutella thompsonii*, importante controlador de ácaros de la familia Euryophdae. Aunque éstos géneros no son de nuestro interés, todos ellos al igual que otros juegan también un papel importante como controladores naturales de insectos plagas e incluso como antagonista, como es el caso de *trichoderma* spp.

Los géneros de nuestra importancia; *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus*, comúnmente empleados en el ámbito agrícola (Anexo F), actualmente pertenecientes a la Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales presentan las siguientes características:

#### ***Beauveria bassiana*:**

Según Nicholls (2008) la muscardina blanca, causada por *Beauveria bassiana* (Anexo H) fue la primera enfermedad causada por insectos de origen fungoso con que se mostró la naturaleza patogénica y contagiosa del hongo infectando el gusano de seda. El hongo *B. bassiana* ocurre en todo el mundo y tiene una de las lista de hospederos más grandes entre los hongos imperfectos. Este hongo entomopatógeno se caracteriza por formar conidióforos en zigzag, insertos directamente en el micelio, en conidias terminales que dejan cicatrices bien definidas cuando se desprenden de éste. La forma y tamaño de las conidias es parámetro para clasificar las especies.

*B. bassiana* se encuentra naturalmente en algunas plantas y en el suelo. En el suelo se desempeña como saprófito. Sus epizootias o enfermedades fúngicas son favorecidas por climas templados y húmedos. Éste hongo puede sobrevivir en el suelo bajo condiciones favorables de oscuridad, alrededor de 365 días como conidia o espora. Para que sus estructuras reproductivas germinen y sean efectivas se requiere de un rango de humedad relativa (HR) de 85% aproximadamente, de una temperatura entre 25 y 30°C y de una luminosidad y un medio nutritivo apropiado (Ver Métodos). Las larvas infectadas por el hongo se

tornan de un color blanco o gris. Los hospederos infectados principalmente se encuentran entre los Órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Hemíptera, Díptera e Himenóptera. *B. bassiana* Tiene una lista extensa de hospederos que incluye a moscas blancas, afidos, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, chinches, hormigas y mariposas. Desafortunadamente enemigos naturales como las mariquitas (Coleópteros) también son susceptibles al ataque fúngico (Nicholls, 2008).

Existen diferentes cepas de *B. bassiana*, al igual que de otros hongos, que exhiben una considerable variación en cuanto a su virulencia, patogenicidad y rango de hospederos. *B. bassiana*, al igual que otros hongos, se diferencia porque produce toxinas que afectan los insectos. La beauvericina; ciclopeptidasa; bassianolide de *B. bassiana* es tóxica cuando se inyecta en el hemocele o cuando el insecto la ingiere; y boberin, es altamente tóxica para lepidópteros y cuyo desarrollo comercial principal lo realizan los rusos (Nicholls, 2008).

*B. bassiana* es la especie de hongo entomopatógeno comercialmente más utilizada alrededor del mundo (Anexo G) contra un gran número de insectos plaga. Las formulaciones de ella, al igual que de otros hongos entomopatógenos, comúnmente consisten en conidias, en forma de polvo, que posteriormente son suspendidas en agua y/o en aceites emulsivos para su respectiva aplicación. Éste hongo y otros eventualmente puede sobrevivir en mezclas con insecticidas; aunque cuando se hace la mezcla en tanque, al momento de adición con otros productos, inicialmente el hongo debe soportar altas concentraciones de ingrediente activo de pesticidas, lo cual puede debilitar al hongo e incluso disminuir ostensiblemente la población de unidades infectivas (esporas o conidias) del entomopatógeno (Anderson y Roberts 1983, citados por Hoyos 2001).

Jiménez (1992) propuso que *Beauveria bassiana* puede causar naturalmente epidemias sobre poblaciones de insectos plaga cuando las condiciones ambientales son favorables, pero este tipo de infecciones no son confiables como forma de control, por lo tanto debe aplicarse en campo de forma masiva.

### ***Metarhizium anisopliae***

Según Bustillo (1987) *Metarhizium anisopliae*, hongo causante de la **muscardina verde**, es una especie muy importante empleada para el control natural de insectos plagas en nuestro país, él es ampliamente distribuido como *B. bassiana* con un vasto rango de hospederos (Anexos B y F). *Metarhizium anisopliae* fue aislado, por primera vez por el investigador Ruso Metchnikoff (1879) a partir del escarabajo *Anisoplia austriaca* (Coleóptera: Scarabaeidae), quien sugirió su utilización como agente microbial en contra de plagas de insectos. *M. anisopliae* en su fase joven presenta una colonia blanca, pero cuando madura las colonias se tornan verde oscuro (Anexo I). Éste hongo presenta dos características como

especie principal de su género, presenta dos variedades de tipos de conidias o esporas, pequeñas y grandes. *Metarhizium anisopliae* de conidios pequeños (3.5-9.0 mm.) y *Metarhizium majus* de conidios grandes (9.0-18.0 mm.) Lecuona (1996). Estas formas varían en virulencia e infectan diferentes hospederos. Otras especies conocidas del género son: *Metarhizium flavoviridae* y *Metarhizium album*, entre otras. El hongo tiene conidióforo ramificado, las esporas son alargadas y se forman en cadenas originadas en fiálides. La conidia más joven es la de la base del conidióforo, las cuales crecen unidas formando una masa prismática de cadenas de esporas. Las conidias son blancas cuando jóvenes, pero se tornan de color verde oscuro a medida que la conidia madura. *Metarhizium anisopliae* es bastante efectivo contra las plagas del suelo, esto se debe a la supervivencia de sus conidios en el suelo por varios años. Milner y Lutton (1976), citados por Bustillo (2008) encontraron que los conidios permanecen viables entre 250 a 560 días en el suelo a 16°C, sin embargo, la supervivencia se reduce a temperaturas por encima o por debajo de ésta, aunque no se encontraron diferencias en la supervivencia a diferentes humedades.

*Metarhizium anisopliae* ha sido reportado por lo menos en 46 países, probándose que existen cepas que difieren tanto en su virulencia como en la habilidad para parasitar insectos diferentes (Lecuona, 1996). El uso de éste para el control de muchos insectos plaga está ampliamente documentado. Quizás uno de los programas mejor conocidos a nivel mundial es el control de langostas en África Lomer *et al.*, (2001), citados por Bustillo (2008) y en Australia (Copping (2001), citado por Bustillo (2008), usando *Metarhizium anisopliae* Variedad *acridum*.

El hongo tiene dos presentaciones comerciales comunes en el mundo: Green muscle TM y Green Guard TM. Miller y Hunter (2001), citados por Bustillo (2008). El desarrollo del producto "Green Muscle", se hizo después de 12 años de investigaciones, con un costo de US\$ 17 millones Shah y pell (2003), citados por Bustillo (2008). Éste producto es recomendado por la Organización de las Naciones Unidas por la Alimentación y la Agricultura, para el control de langostas migratorias (Lomer *et al.*, 2001, citados por Bustillo 2008). *M. anisopliae* también se ha utilizado en Brasil para el control de salivitas o miones, *Mahanarva posticata*, en caña de azúcar Guago (1973); Alves (1998), citados por Bustillo (2008). En este cultivo se asperjan unas 150.000 ha. Según Nicholls (2008) *M. anisopliae* también es empleado para control de chinches de la familia Cercopidae en el cultivo de alfalfa. También se ha registrado el uso comercial de este hongo para el control de termitas en Australia y Estados Unidos (Hanel y Watson 1983, citados por Bustillo 2008). *Metarhizium anisopliae* es producido comercialmente en Alemania y Brasil (BIO 1020 y Metabiol) y también es producido "artesanalmente" en Cuba, Brasil y otros países (Lecuona, 1996).

De el hongo *M. anisopliae* se han aislado varias toxinas designadas como dextruxinas A, B, C, D y Mesmetil-dextrucina. Estas toxinas causan parálisis; ellas se liberan durante la digestión de las esporas en el intestino medio del insecto.

### ***Paecilomyces* spp.**

Debido a la infección de coloración amarilla causada por algunas especies del hongo, la enfermedad es conocida por algunos como **muscardina amarilla** (Nicholls, 2008). *Paecilomyces* es un hongo que se caracteriza por poseer esporas o conidias que surgen en su mayoría a partir de hifas aéreas algunas veces ausentes; forman conidióforos ramificados y agrupados en paquetes característicos llamados sinemas o coremios Alexópolis (1964), citado por Rodríguez (1993). Según Rodríguez (1989) las especies pertenecientes a éste género forman conidióforos ramificados como se dijo anteriormente, presentan fiálides engrosadas en la base y terminadas en el cuello en forma de botella; las esporas son de color rosado generalmente (Anexo J), aunque Samson (1981) dice que algunas especies pueden presentar una coloración blanca o amarilla, como ya se había dicho anteriormente.

*Paecilomyces* spp. ha sido aislado en suelos de más de 60 países incluyendo Colombia, lo que demuestra su carácter cosmopolita respecto a hábitats y hospederos. Según Nicholls (2008) éste género se encuentra por lo general en la naturaleza en un amplio rango de hospederos (Anexos B y F), principalmente larvas de lepidópteros. Aunque Alves (1986) lo reporta sobre lepidópteros, coleópteros, homópteros y ortópteros. Así mismo Bustillo (1987), lo menciona atacando insectos del Orden hemíptera; además éste género posee especies parásitas de nematodos de plantas. Recientemente Copping (2001); Alves y otros (2003), citados por Bustillo (2008), afirman que las especies *Paecilomyces fumosoroseus* y *Paecilomyces lilacinus* son comunes y presentes en Colombia y otros países, son utilizados principalmente en el control de plagas de invernadero como moscas blancas, áfidos y trips. También son utilizados en el control de *Cacopsylla pyricola*, plaga de la pera, en combinación con formulaciones comerciales de *B. bassiana* (Puterka 1999, citado por Bustillo 2008).

Entre las especies más comunes de este género tenemos: *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces amoeneroroseus*, *Paecilomyces javanicus*, *Paecilomyces ramosus*, *Paecilomyces coleopterorum*, *Paecilomyces tenuipes*, *Paecilomyces cicadae*, *Paecilomyces lilacinus* y *Paecilomyces cinnamoneus*, entre otras.

#### 1.2.4 Características de la acción de los hongos patógenos de insectos

- **Clases de parasitismo de hongos sobre insectos**

Este tipo de interacción incluye a hongos necrótrofos (matan a su hospedero y utilizan sus tejidos muertos como fuente de nutrientes) y hongos biótrofos (hongos que requieren células vivas de sus hospederos). Los **Parásitos necrotrofos** (Anexo E) son aquellos que parasitan células muertas en sus hospedantes, por lo tanto tienen que aniquilar a su hospedante antes de consumirlo. Éste tipo de hongos son muy específicos en su ataque, por esta razón muchos de ellos son potenciales agentes de control biológico de insectos. Algunos de estos parásitos, presentan especies que solamente esporulan sobre los tejidos del insecto, incluso cuando éste aún está vivo, sirviendo al hongo como método de dispersión sobre más hospedantes Fusa y Tanada (1987), Citados por Hoyos (2001). A diferencia de los anteriores, los **Parásitos biótrofos** (Anexo E) son hongos conocidos como Trichomycetos, éstos son hongos altamente especializados y pertenecen a las clases Ascomycota, Zigomicota, y Basidiomicota. Debido al grado de interacción tan estrecho, Ellos poseen características únicas de colección y estudio Fuxa y Tanada (1987), Citados por Hoyos (2001). Cerca de 225 especies de 55 géneros son conocidos; ésta clase de hongos abunda en muchas regiones, pero no son ampliamente usados ya que son de difícil observación a simple vista. Todas las especies están asociados a artrópodos mandibulados detritívoros, algívoros u omnívoros, pero al parecer no se hallan asociados con aquellos que son depredadores, carnívoros o que consumen tejidos o plantas vasculares. Muchos de éstos parecen ser comensales inocuos, que obtienen sus nutrientes de la digestión del insecto en el paso de nutrientes en el intestino (Fuxa y Tanada 1987, Citados por Hoyos 2001).

- **Modo de acción de los hongos patógenos insectiles**

Una enfermedad se produce en un hospedero susceptible por el efecto de sustancias químicas o tóxicas, también por el efecto de destrucción mecánica de células y tejidos como en el caso de penetración al insecto, o por la combinación de los anteriores procesos. El término epizootia, íntimamente relacionado con el daño, es definido como la infección de un hongo de forma general en una población de insectos plagas (Anexo D). Las epizootias pueden ser inducidas en ambientes agrícolas con el fin de controlar insectos perjudiciales en cultivos. Las infecciones o daños ocasionados en las epizootias tienen su manera de ser cuantificados ya que por medio de cálculos estadísticos hechos por muestreos aleatorios tomados en campo se pueden definir numéricamente grados de infección o daño ocasionado (Alves, 1986; Lecuona, 1996).

Según McCoy *et al.*, (1996), citados por Hoyos (2001) varios son los componentes tóxicos causantes de enfermedad que se han aislado de algunas especies de hongos tales como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomouraea*, *Aspergillus*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Isaria*, *Fusarium*, *Cordyceps*, *Entomophthora*, y demás. Los insectos pueden exponerse a toxinas fungales por medio de tres mecanismos, como lo son, la ingestión, contacto cuticular y dentro del insecto en el hemocele. Las toxinas fungales cumplen como función primordial aniquilar individuos, Aunque algunos hongos entomopatógenos matan a sus hospederos, más por una acción invasiva, que por una tóxica. Existen dos tipos de toxinas producidas por los hongos patógenos de insectos que causan daño, éstas son las catabólicas y las anabólicas. Las **toxinas catabólicas** pueden originarse del sustrato o de la descomposición del patógeno; por ejemplo, el desdoblamiento de proteínas, carbohidratos y grasas por el patógeno, que produce alcoholes tóxicos, ácidos, mercaptanos y alcaloides. A diferencia de las anteriores las **toxinas anabólicas** son propias de sustancias sintetizadas por el patógeno. Se clasifican como exotoxinas y endotoxinas. Las **exotoxinas** se conocen como ectotoxinas, verdaderas toxinas o toxinas solubles. Ellas se secretan o pasan al exterior de las células del patógeno. Por ejemplo, hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* produce dextruxinas tóxicas a insectos. *Beauveria bassiana* produce proteasas, bassianolide ms tóxico que beauvericina contra el gusano de seda u otros. El beauverin, es un péptido aislado también de *B. bassiana* y es una de las sustancias más estudiadas McCoy *et al.*, (1996), citados por Hoyos (2001). El patógeno (hongo) produce las **endotoxinas**, las que la célula no excreta sino que confina. Estas toxinas se liberan cuando el patógeno muere y degenera (Nicholls, 2008).

Los signos y síntomas de ataques de un hongo en un insecto se caracterizan porque, los insectos infectados paran de alimentarse y caen en un letardo, posteriormente mueren. Si estos están localizados en un cultivo, pueden permanecer aún muertos prendidos de tallos u hojas en posición elevada o confinadas a los bordes del cultivo. El cuerpo del insecto muerto es firme y con consistencia blanda o vacía, las paredes del cuerpo toman el color crema, verde o rojo y en algunos casos café, ello se debe a que los hongos pueden envolver el cuerpo o cutícula demostrando diversas características (color, estructuras, etc.) que los caracterizan (McCoy *et al.*, 1996, citados por Hoyos 2001).

La eficacia o efectividad de estos hongos contra los insectos plaga es dependiente de factores, como, la especie o cepas específicas del hongo patógeno a usar (especie, raza o aislamiento patogénico), de la población de insectos y su etapa de vida susceptible, de las condiciones ambientales favorables como la humedad, temperatura, textura del suelo e insecto adecuadas, de condiciones de dispersión favorables (viento, agua, suelo, insecto, hombre, etc.), entre otras.

### **1.2.5 Propiedades más importantes de los hongos entomopatógenos**

De acuerdo con Nicholls (2008), las propiedades más importantes de los seres fúngicos de insectos son: la virulencia, patogenicidad, capacidad para sobrevivir o persistir y la capacidad para dispersarse; sin embargo Fargues y Remaudiere (1997), citados por Rodríguez (1992) proponen otras propiedades como, las posibilidades de multiplicación y conservación en condiciones económicamente rentables y el alto poder de permanencia.

La virulencia es el poder de un microorganismo de producir enfermedad, es decir, la habilidad de un microorganismo de invadir y causar daño al hospedero. Es la capacidad de un microorganismo para evitar los mecanismos de defensa del hospedero. Un patógeno puede ser muy virulento a causa de la baja resistencia o alta susceptibilidad del hospedero y a su vez puede tener baja virulencia por la alta resistencia o baja susceptibilidad del hospedero. La patogenicidad, es no más que la medición de la virulencia y se puede expresar como el grado de afectación o daño del hongo hecho al hospedero.

La capacidad para sobrevivir o persistir se ve favorecida por condiciones como la humedad baja, temperatura y presencia de excrementos, cadáveres o residuos orgánicos. La persistencia en el medio ambiente biótico de hospederos primarios y secundarios, parásitos, depredadores y otros puede ser más importante que la persistencia en un medio físico (Agar nutritivo, etc.) Nicholls (2008). La capacidad para dispersarse es dependiente de la persistencia del hongo, ya que es necesario un considerable porcentaje de esporas o conidios viables que establezcan e infecten el hongo entomopatógeno en sus huéspedes; aunque también agentes abióticos como viento, lluvias, temperatura, humedad del medio, entre otras son influyentes en la capacidad de dispersión del hongo en el medio natural. La dispersión por medio de consideraciones humanas (inundación artificial), es la más considerada para los cultivos agrícolas.

Los hongos entomopatógenos se multiplican y dispersan dentro del mismo agroecosistema lo que posibilita su transmisión generacional y un nivel de reducción natural de la plaga. Pueden permanecer en el área, tanto en insectos vivos o en sus cadáveres, como en el suelo. Además, pueden ser transmitidos de una generación a otra de un insecto plaga, al contaminar los huevos o desoves, e infectarse las crías recién nacidas (Nicholls, 2008).

Respecto a las propiedades citadas por Rodríguez anteriormente, se hablará principalmente de ellas en el párrafo a continuación.

### 1.2.6 Reproducción de los hongos entomopatógenos

- **Crecimiento, desarrollo y propagación:** el ciclo de vida típico inicia con una espora o conidia, la cual llega a la cutícula del insecto (Anexo C). Posteriormente y bajo condiciones óptimas, la espora germina, produce un tubo germinativo que crece y penetra al interior de la cutícula dentro del hemocele. Una vez en la hemolinfa, el hongo coloniza el insecto. Al inicio de la infección se observan pocos o ningún signo o síntoma, excepto por algunos puntos necróticos. El insecto pierde motilidad y apetito. Internamente existen cambios en el contenido proteico de la hemolinfa. Los insectos en general continúan su crecimiento y desarrollo. La colonización completa del hongo sobre el cuerpo del insecto requiere de siete a diez días, después de los cuales el insecto muere. Algunos hongos producen toxinas pépticas durante el crecimiento vegetativo, con estas razas la muerte de los insectos ocurre en 48 horas. En consecuencia, si las condiciones son favorables, lo que significa un ambiente con humedad relativa alta (80% o más) en la época cercana a la muerte del insecto, el micelio formará estructuras reproductivas, esporas, y así completa el ciclo de vida. (Nicholls, 2008).

Según el tipo y especies de hongos, éstos se reproducen interna o externamente y pueden ser esporas resistentes, sporangia o conidia. Los cuerpos de los insectos muertos pueden encontrarse sobre el follaje, en algunas ocasiones se encuentran cubiertos por el micelio del hongo, en otras se observa el hongo que emerge de las articulaciones y segmentos del cuerpo (Nicholls, 2008).

Finalmente, el desarrollo de un hongo entomopatógeno se puede resumir en la secuencia respectiva como lo es: primero la adhesión, segundo la germinación, tercero la penetración, cuarto la multiplicación y producción de toxinas, quinto la muerte del insecto y/o colonización, sexto la presencia de micelio al exterior, séptimo la esporulación y por último octavo la diseminación.

- **Preservación y producción:** según Bustillo (2008) las cepas de los hongos deben conservarse para mantener la pureza y virulencia de los aislamientos a través del tiempo; pero también con el fin de mantenerlas disponibles para su utilización. Para lograr el crecimiento y esporulación de los hongos entomopatógenos es necesario aportarles las condiciones y nutrientes necesarios; la temperatura, la humedad, luz, entre otros (ver Metodología), porque la falta de alguno de éstos factores puede contribuir a la pérdida de la patogenicidad del hongo. Para conservar los hongos entomopatógenos viables se pueden utilizar diversos medios de cultivo. Medio de cultivo es toda sustancia o solución que permite el crecimiento de uno o más organismos; mientras que cultivo, es el producto del crecimiento de un organismo (ver métodos).

Los medios de cultivo empleados para producción de hongos entomopatógenos en laboratorio pueden ser tanto simples como complejos. Ellos deben suministrar elementos necesarios como carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc. para la correcta multiplicación del hongo; en ciertos casos éstos requerimientos varían con las distintas especies fúngicas. El pH de éstos debe ser ligeramente ácido, para facilitar el crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Además los medios deben contener antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de las bacterias saprófitas que suelen contaminar las muestras. Los más usados son Gentamicina y Cloranfenicol. Los medios pueden ser divididos en sólidos y líquidos, aunque otros como lo es el bifásico también puede ser empleado. El sólido se diferencia del líquido en un componente principal el cual es solidificante, pero al igual pueden presentarse diferencias en algunos otros agentes, que al parecer pueden ser determinantes en algunas especies de hongos (ver Resultados).

El medio bifásico trata de aprovechar las virtudes de ambos; en la cual, una primera etapa consiste en la multiplicación en medios líquidos para obtener micelio en abundante cantidad, seguida de una segunda etapa en la cual el micelio obtenido es distribuido en bandejas plásticas u otros recipientes (bandejas de aluminio o icopor, etc.); luego los recipientes con el respectivo micelio son alojados en espacios con condiciones de temperatura luz y humedad controlada hasta alcanzar una excepcional esporulación. Ésta forma de producir conidias ha sido empleada con gran éxito para propagar hongos entomopatógenos a gran escala. Algunos de los medios y nutrientes más comunes empleados para la producción de hongos entomopatógenos son: Agar-papa-dextrosa, extracto de malta y pectona micológica, harina de avena, arroz, quitina o leche descremada, entre otros (Lecuona, 1996).

(Ver más adelante en la tabla 1).

**1.2.7 Control de insectos plagas con hongos entomopatógenos:** el control de insectos plagas en cultivos (Anexo F), consiste en la aplicación de entomopatógenos nativos o introducidos, con el fin de lograr una reducción de la población de insectos, de tal forma que no se alcance en el cultivo niveles de daño económico. Esta estrategia es muy similar a la de aplicación de productos fitosanitarios, tanto en sus objetivos como en su formulación y forma de aplicación. Según Fuxa y Tanada (1987), citados por Hoyos (2001), para las condiciones en campo deben ser de gran importancia la aplicación de cantidad adecuada o considerable del hongo, ésta se resume en unidades formadoras de colonia (UFC) o conidios o esporas por gramo, es decir, que aplicar una cantidad considerable de UFC aumenta la probabilidad de que se inicie infección de la población objetivo. La cantidad de UFC se denomina dosis infectiva y es específica para cada formulación. Para que la aplicación se cumpla con éxito debe garantizarse la mayor cobertura de estructuras o sitios en el campo donde se halla el insecto perjudicial, por ejemplo no se deben hacer aplicaciones al suelo si la plaga se

halla en el follaje o viceversa. Así mismo el uso de adherentes y dispersantes como lo son los aceites u otros productos, garantizan una solución homogénea y perdurable en la aplicación.

En general, el grupo de los Ascomicetos son los más utilizados para el control por inoculación inundativa o artificial, debido a que se pueden producir relativamente fácil, son de rápido crecimiento, se pueden formular y tienen una vida media superior a otros hongos. Existen varias especies que se han desarrollado comercialmente alrededor del mundo como se ha descrito previamente.

El uso de formulaciones de hongos entomopatógenos se ha caracterizado por la aplicación de una sola cepa. Con el fin de obtener una mayor eficacia de los hongos patógenos de insectos, se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos genéticos que dan a éstos hongos sus características de patogenicidad y virulencia. El uso de mezclas de cepas de hongos con otros biocontroladores ya ha sido reportado aquí en Colombia, se ha reportado el uso de cocteles microbianos consistentes en mezclas de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *P. fumosoroseus* y la bacteria *Bacillus thuringiensis*. La mezcla está registrada para ser usada en una gran variedad de insectos plagas como lepidópteros, coleópteros, hemípteros, dípteros, y ácaros Alves *et al.*, (2003), citados por Bustillo (2008).

Algunos de los biocontroladores pueden tener efectos sinérgicos con prácticas agrícolas como por ejemplo la aplicación de materia orgánica y *Trichoderma* spp. (hongo antagonista). Otros como la aplicación simultánea de entomopatógenos en mezcla de tanque no son interferentes a la mezcla de algunos insecticidas; por el contrario en casos se presentan efectos nocivos del químico sobre los hongos (Fuxa y Tanada 1987, citados por hoyos 2001).

Ciancio y Mukerji (2008) afirman que la seguridad ofrecida en el empleo de hongos entomopatógenos para el hombre y otros animales es plena; o sea que se puede decir que ellos no causan ningún perjuicio a vertebrados. Lecuona (1996), Además, entre otras cosas, el autor dice que ellos difícilmente logran desarrollarse dentro de la temperatura normal de los mamíferos. Sin embargo, anterior a lo dicho, existen algunas especies que su seguridad presentan ciertas dudas como es el caso de *C. coronatus*. También se pueden presentar posibles problemas alérgicos debidos a la inhalación de partículas fúngicas por los operarios de las biofabricas; dados problemas varían con la predisposición de cada persona, así como ocurre con el polen de ciertas flores.

Según Bustillo y Posada (1996) La producción de hongo contenida en una botella de vidrio de 375 ml., es suficiente para asperjar 100 árboles de café a una dosis de  $5 \times 10^8$  esporas/g. Durante los tres últimos años de la anterior década Cenicafé y el servicio de Extensión de la Federación Nacional de Cafeteros de nuestro país han entrenado en ésta técnica a más de 20.000 agricultores, muchos de los cuales

producen o produjeron el hongo eficientemente, pero la mayoría han tenido un gran hincapié con las técnicas de cría artificial o masiva de hongos en laboratorio ya que no han tenido herramientas necesarias para un adecuado trabajo. Hace algunos años a las formulaciones de hongos entomopatógenos, el ICA les ha venido imponiendo un sistema de control de calidad, éstas se vienen realizando con la finalidad de asegurar a los agricultores que los biopesticidas que adquieren reúnen los estándares apropiados para garantizar su uso exitoso en el campo. Éste protocolo ha servido de base para la reglamentación de la producción de entomopatógenos que actualmente funcionan en el país (Bustillo y Posada, 1996).

**1.2.8 Perspectivas en el uso de hongos entomopatógenos:** según Bustillo (2008) la mayoría de hongos evaluados hasta ahora como agentes de control biológico pertenecen básicamente a un pequeño grupo de género, anteriormente de los Deuteromycetos y ahora de los Ascomycetos. Pese a la estrecha taxonomía de los hongos entomopatógenos como se ha dicho, se propone que ésta base genética debe ser ampliada, en este caso, por los diferentes gremios especialistas que se dediquen a las tareas de coleccionar nuevas fuentes de germoplasma de hongos entomopatógenos, al igual que investigar acerca de las interacciones insecto-hongo para así logra obtener nuevas cepas y aun más virulentas.

Los hongos entomopatógenos en un futuro próximo podrían contribuir significativamente en el control de los insectos y arácnidos plagas, directamente en forma de micoinsecticidas (esporas o conidios), o indirectamente a través de la utilización de sus metabolitos secundarios (Toxinas fúngicas).

Según Samson *et al.*, (1988) dicen que en Colombia el gran bosque de Chocó y la Amazonía que cubre los departamentos de Putumayo, Caquetá y Amazonas, son tesoros potenciales escondidos de nuevas razas y especies únicas de hongos entomopatógenos, ya que ambos aspectos como el clima y la diversidad de artrópodos favorecen su evolución. La colección intensiva de estos hongos es esencial para juntar la mayor cantidad posible de germoplasma con potencial en el biocontrol, mientras el hábitat del bosque exista.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 LOCALIZACIÓN

Ésta investigación se realizó durante los meses de septiembre de 2009 y febrero de 2010 en el laboratorio de agrobiológicos del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid (regional Oriente), ubicado en el barrio altos de la Pereira, en el municipio de Rionegro, Departamento de Antioquia. El municipio se encuentra localizado en las coordenadas 6°9'18"Norte y 75°22'48"Oeste, a una altura sobre el nivel del mar de 2.125 m. La precipitación promedio anual varía entre 1.800 y 2.500 milímetros, la temperatura media es de 17 °C y la humedad relativa oscila entre 75 y 85%.

### 2.2 MATERIALES Y EQUIPOS

Ácido láctico	Cloranfenicol
Agar PDA comercial	Cubre objetos
Agitador vortex	Cuchara mezcladora
Agua destilada estéril	Erlenmeyers 250 ml.
Arroz	Fosfato monopotásico ( $K_2HPO_4$ )
Asa de vidrio	Incubadora
Asa metálica	Mechero
Autoclave	Micropipeta mecánica 0-10 $\mu$ l.
Azul de lactofenol	Micropipeta mecánica 10-100 $\mu$ l.
Balanza Digital	Microscopio de luz
Bandejas de aluminio e icopor (poliestireno)	Plancha agitadora y calentadora
Barra agitadora	Porta objetos
Beakers 100 ml.	Porta tubos Ependorf
Bolsas de polietileno	Puntas para micropipetas
Cajas petri	Sal
Cámara de flujo laminar	Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )
Cámara de Neuvauer	Tubos Ependorf
Carbonato de calcio ( $CaCO_3$ )	Tween
Cepas de hongos	Vinilpel

## 2.3 MÉTODOS

En el laboratorio de agrobiológicos, se utilizó como material de estudio los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* los cuales son de gran importancia para el control biológico de insectos plagas en la agricultura. Con ellos se realizaron cultivos bifásicos o en arroz, se realizaron pruebas una vez por triplicado y se compararon los resultados por anova y prueba de tukey ( $\alpha=0,05$ ) usando el programa Statistic.

**2.3.1 Cepas de los hongos entomopatógenos:** las cepas de los hongos *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* fueron obtenidas del laboratorio de bioinsumos de Cenicafé y cultivadas en Agar papa dextrosa (PDA) (Anexos H, I y J) como lo proponen (Verhaar y Hijwegen 1993, citados por Gallego 1997). Para los ensayos los cultivos de los hongos fueron incubados (Anexo K) por 7 días a 26 °C, con fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad. Los cultivos esporulados fueron conservados en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Para la inoculación de los cultivos líquidos se preparó una suspensión de conidias que se obtuvieron de un cultivo previo de cualquiera de los hongos *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* (Anexo L). En la superficie del PDA con el hongo crecido y esporulado se depositaron 10 ml. de agua destilada estéril (ADE) y con un Asa metálica se rasparon las conidias para formar una suspensión. Luego se determinó la concentración de conidias en la suspensión y se ajustó con ADE a  $1 \times 10^6$  conidias/ml. De ésta preparación se utilizó 1 ml. como inóculo para los cultivos líquidos en Erlenmeyers.

### 2.3.2 Preparación de los medios de cultivo líquidos

Se realizaron cultivos bifásicos de los hongos *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* con el fin de obtener micelio en la fase líquida del proceso (Anexo M) y luego conidias en la superficie del medio de cultivo (ver más adelante en figura 4). Éste procedimiento de cultivo bifásico se modificó para no usar un sustrato sólido durante la esporulación del hongo, sino que se obtienen las conidias de la capa superficial del medio de cultivo que se forma cuando el micelio se deposita en bandejas y se deja inmóvil por un periodo de tiempo (ver más adelante en figuras 2, 3 y 4).

Se utilizaron ingredientes como glucosa, extracto de levadura, harina de soya y trigo y sales minerales como ingredientes de los medios de cultivo líquidos. Los anteriores ingredientes propuestos son también comunes por los autores Verhaar y Hijwegen (1993), citados por Gallego (1997) y Lecuona (1996) (Tabla 1). Los medios de cultivo líquido fueron preparados, inoculados y divididos en Erlenmeyers de 250 ml. con 100 ml. de cada medio de cultivo respectivo (Anexo N). Se esterilizó en autoclave a 121 °C a 15 psi por 15 minutos (tabla 1). Una vez preparados se incubaron a 27 °C, 200 rpm, durante cuatro días (Anexo N).

Una vez el hongo había crecido y presentado su micelio característico, se verificó al microscopio de luz y mediante siembra en PDA la pureza del cultivo. Posteriormente, la suspensión de micelio se depositó en bandejas para permitir la esporulación de los hongos. Las bandejas con micelio fueron cubiertas con vinilpel para evitar contaminación (ver más adelante en figura 4). Estos cultivos se incubaron a 30 °C con fotoperiodo 12: 12 horas luz:oscuridad. Se utilizaron bandejas de aluminio e icopor estériles de 13.5 cm. de largo con 9.5 de ancho. Una vez el cultivo había esporulado fue secado en estufa a 40 °C por 4 días o hasta que la humedad llegara a 15%.

También se evaluó el alto de la columna de la suspensión de micelio en la bandeja y se tomaron valores de 2 a 5 mm.

**2.3.3 Preparación de los medios de cultivo sólidos en arroz:** los resultados de los cultivos bifásicos se compararon con el cultivo tradicional utilizando arroz como sustrato en bolsas de polietileno (Tabla 1). Al arroz se le agregaron 40 ml. de una solución de agua, ácido láctico al 0.2% y Cloranfenicol al 0.05%

Las bolsas con arroz se esterilizaron en autoclave a 121 °C a 15 psi por 15 minutos. Posteriormente fueron inoculadas con 1 ml. de la suspensión de conidias del hongo previamente preparada (Anexo O).

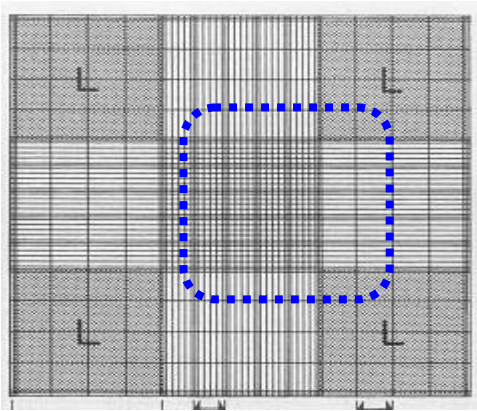
**Tabla 1.** Ingredientes de los medios de cultivo líquidos utilizados para la obtención de micelio

Ingredientes (g/l.)	Medio1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Fosfatomonopotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1	1			
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	2	2			
Extracto levadura	5	5			
Glucosa	10	20, 30 ó 40	10	10	
Harina de soya			15	15	
Sal			5	5	
Carbonato de calcio (CaCO <sub>3</sub> )			2	2	
Cloranfenicol			0.05	0.05	0.05
Harina de trigo			50 (para 100 ml. de cultivo)	25(para 100 ml. de cultivo)	
Arroz					100g. (En bolsa)
Ácido láctico					0.2

## 2.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

**2.4.1 Pruebas de evaluación de los cultivos de hongos:** Vélez *et al.*, (1997), recomiendan las siguientes técnicas utilizadas para el control de calidad de las formulaciones con hongos entomopatógenos:

- **Determinación de la concentración:** con el fin de evaluar la concentración de conidias se tomaron 10 g. de cultivo de hongo presente en bandeja y se les adicionó agua destilada estéril (ADE) mas tween al 0.05% hasta ajustar 100 ml. de solución. De la preparación resultante se realizaron diluciones seriadas 1:10, hasta  $1 \times 10^{-5}$  (Anexo P). Luego, se tomaron 10  $\mu$ l. de la dilución  $10^{-3}$  o  $10^{-4}$  y se determinó la concentración de conidias usando un Hemocitómetro o Cámara de Neubauer (Figura 1). Se hizo conteo de conidias por tres veces y se obtuvo el promedio. Para tener el dato final de concentración se utilizó la formula; Concentración de conidias/ml.= Nº de conidias  $\times 10^{(\text{inverso dilución})} \times 10^4$  (Factor de corrección del hemocitómetro). Éste resultado nos da la concentración de conidias por mililitro de solución Lecuona (1996). Para obtener el resultado en conidias por gramo de formulado, se multiplica por la masa en gramos utilizada y se divide por el volumen inicial en que se preparó la suspensión.



**Figura 1.** Apariencia del rayado de la Cámara de Neubauer o Hemocitómetro. El conteo de conidias se hace en el recuadro central que está demarcado en la gráfica con una línea punteada.

- **Determinación de la viabilidad:** con las diluciones preparadas en el paso anterior se realiza también la determinación de la germinación o viabilidad de las conidias de hongos. Se sembraron alícuotas de 10  $\mu$ l. en Agar agua, de las diluciones  $10^{-2}$  o  $10^{-3}$  y se incubaron a 30°C por 24 horas. Luego, sobre la superficie del Agar se agregaron 3 gotas de azul de lactofenol, se cortó un trozo

de Agar y en el microscopio de luz se contaron las conidias germinadas y las no germinadas. Una conidia germinada es aquella que presenta tubo germinal.

La viabilidad o germinación se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

Conidias germinadas (%)= (Nº Conidias germinadas/ Nº Conidias totales) x100

- **Determinación de la pureza:** con las diluciones preparadas en el paso anterior se realiza también la determinación de la pureza del cultivo. Para ello se sembraron alícuotas de 100 µl. en PDA de las diluciones  $10^{-2}$  o  $10^{-3}$  y se esparcieron con Asa de vidrio por la superficie del Agar. Se incubó a 30°C hasta por 72 horas. Posteriormente se contó el número de colonias de microorganismos contaminantes y no contaminantes (hongo) y se comparó su proporción (Anexo J).

El dato de pureza se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

Porcentaje de pureza (% P)= (UFC hongo evaluado/ UFC total) x 100

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el medio 1 (Tabla 1.), aunque se obtuvo crecimiento del micelio de los tres hongos, en las bandejas sólo se obtuvo esporulación de *M. anisopliae* con una concentración de  $1,9 \times 10^7$  conidias/g. y una germinación de 75.3% (Figura 2, Tabla 2). En el medio 1 los hongos *P. lilacinus* y *B. bassiana* no presentaron esporulación. Buscando un mejor resultado en cuanto a la esporulación de los hongos se evaluó el medio 2 que es el mismo medio 1 pero con cantidades más altas de glucosa (tabla 1). En este caso, el crecimiento de micelio de cualquiera de los tres hongos en el medio con 20, 30 o 40 g/l de glucosa fue mínimo y ni siquiera fue posible verterlo en las bandejas. De acuerdo con los resultados en los medios 1 y 2 no se obtuvo una esporulación y germinación superior a la del cultivo tradicional en arroz (medio 5). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de concentración de *M. anisopliae* en medio 1 y medio 5, pero la germinación de las conidias del hongo si fueron significativamente más bajas en el cultivo bifásico (medio 1) que en el arroz (medio 5) (Tabla 2).

Según los investigadores de Cenicafé Bustillo y Posada (1996), los cuales han trabajado por varios años con *B. bassiana* y otros hongos cultivados en arroz, consideran una concentración apropiada de conidias o esporas para llevar a campo de  $5 \times 10^8$  esporas/g.

**Tabla 2.** Resultados de concentración y viabilidad de conidias de *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* cultivados en distintos medios

Medio de cultivo	Microorganismo	Concentración (Conidias/gr) <sup>1,2</sup>	Viabilidad (%) <sup>1,3</sup>
M1	<i>M. anisopliae</i>	$1,9 \times 10^7$ b	75,3 b
M3	<i>M. anisopliae</i>	$2,8 \times 10^7$ b	95,0 a
	<i>B. bassiana</i>	$3,6 \times 10^7$ b	95,7 a
	<i>P. lilacinus</i>	$2,1 \times 10^8$ b	96,7 a
M4	<i>M. anisopliae</i>	$3,2 \times 10^8$ b	95,0 a
	<i>B. bassiana</i>	$6,5 \times 10^{10}$ a	95,7 a
	<i>P. lilacinus</i>	$7,0 \times 10^{10}$ a	96,7 a
M5	<i>M. anisopliae</i>	$3,6 \times 10^9$ b	95,7 a
	<i>B. bassiana</i>	$1,2 \times 10^{10}$ b	95,0 a
	<i>P. lilacinus</i>	$6,4 \times 10^9$ b	96,3 a

<sup>1</sup> Los datos en cada columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes anova y prueba de tukey ( $\alpha=0,05$ ).

<sup>2</sup> Resultados de análisis estadístico para el parámetro concentración (Anexo Q).

<sup>3</sup> Resultados de análisis estadístico para el parámetro germinación (Anexo R).

Cabe decir que en el cultivo, en el medio 1 sólo se presentó esporulación de *M. anisopliae* cuando la altura de columna de la solución de micelio fue de 5 mm., debido a que cuando era de 2 mm. se secó en 2 días. Por lo anterior, se decidió que en adelante en todos los ensayos se haría con una altura de columna de 5mm.



**Figura 2.** Bandeja con *M. anisopliae* cultivado en medio 1. Se observa la poca esporulación del hongo.

En el medio 3 se obtuvo abundante crecimiento de micelio que fue depositado en bandejas en las que había puesto una capa de harina de 50 g. esparcidos en el fondo y que se esperaba que estimulara la esporulación del hongo. Pero, en éste experimento no se obtuvo una buena esporulación de los hongos debido a que la suspensión de micelio no alcanzó a cubrir uniformemente la capa de harina y se formaron grumos (figura 3). A pesar de ello se alcanzaron concentraciones de conidias superiores a  $2.8 \times 10^7$  conidias/g. y con porcentaje de germinación superior a 95%, para todos los hongos evaluados (Tabla 2). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de concentración y germinación de *M. anisopliae*, *P. lilacinus* y *B. bassiana* cuando se sembraron en medio 3 y en medio 5 que era con arroz.

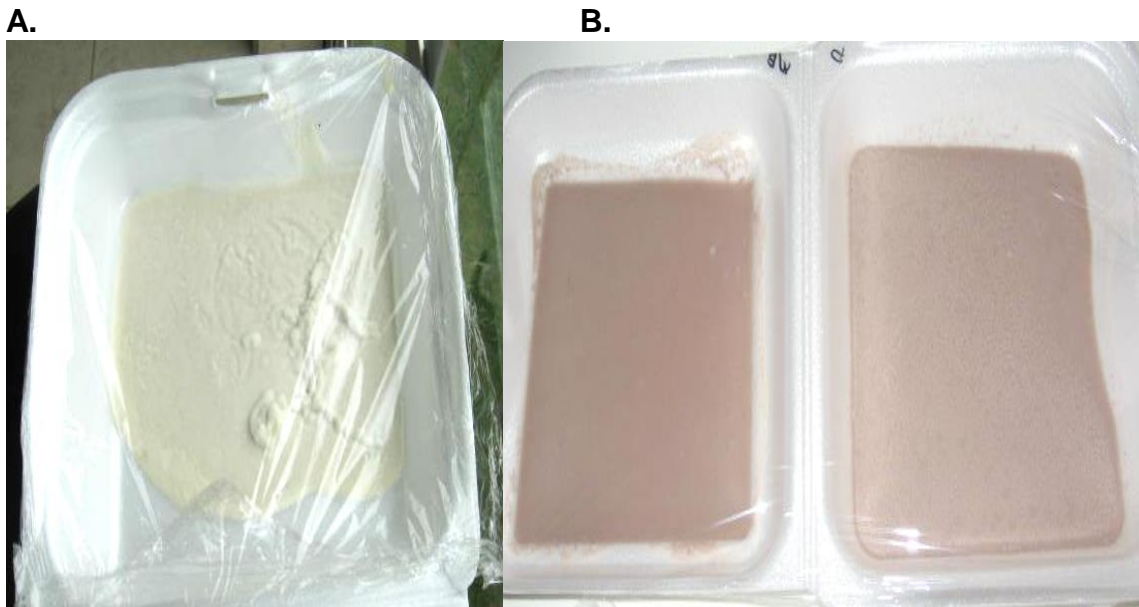


**Figura 3.** Bandeja con *B. bassiana* cultivado en medio 3. Se observa formación de grumos y distribución no uniforme del micelio.

De acuerdo con los resultados del cultivo en el medio 3 se decidió incluir la harina de trigo en el medio de cultivo 4, pero ésta se utilizó a razón de 25 g/l. Se encontró que la concentración de conidias aumentó significativamente respecto a los otros medios de cultivo. *P. lilacinus* y *B. bassiana* presentaron concentraciones de  $7,0 \times 10^{10}$  y  $6,5 \times 10^{10}$ , conidias/g., respectivamente. Mientras que *M. anisopliae* alcanzó una baja concentración de  $3,2 \times 10^8$  UFC/g. La viabilidad estuvo por encima de 95% para cualquiera de los hongos evaluados (Figura 4, Tabla 2).

Los resultados obtenidos en el medio 4 superan los datos obtenidos en el cultivo tradicional en arroz en los tres hongos analizados, respecto a su concentración; éstos resultados superan los propuestos por los investigadores de Cenicafé Bustillo y Posada (1996), los cuales proponen una dosis de  $5 \times 10^8$  esporas/g.

La viabilidad de las conidias no presentó diferencia significativa.



**Figura 4.** Bandejas con esporulación de hongos en medio 4. **A.** *B. bassiana*; **B.** *P. lilacinus*.

### 3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS CULTIVADOS OBSERVADOS AL MICROSCOPIO

Los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus* y *Beauveria bassiana* presentan a continuación una descripción y observación realizadas en laboratorio:

***Beauveria bassiana***, al microscopio presentó conidióforos largos simples, generalmente agrupados en verticilos, globosos en la base y delgados en la parte apical. Conidias saliendo apicalmente en forma de zigzag, hialinas de forma ovoide a redondeadas. Esto concuerda con lo expresado por (Nicholls, 2008; Lecuona, 1996).

***Metarhizium anisopliae***, al microscopio presentó conidióforos que forman densas capas de esporas. Conidias agrupadas en cadenas, formando columnas compactas; de color verde oliva y forma cilíndrica a ovoide, lo cual se corrobora la información con lo expresado por (Lecuona, 1996).

***Paecilomyces. lilacinus***, al microscopio mostró conidióforos erectos, hialinos, ramificados verticalmente y terminados en fiálides en forma de botella. Conidias hialinas, globosas, superficie lisa, ubicadas en el ápice, formando cadenas; confirmándose así lo anotado por (Rodríguez, 1989; Samson, 1981).

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El procedimiento de cultivo bifásico fue apropiado para obtener micelio y conidias viables de hongos entomopatógenos.

En el medio 2 no se presentó crecimiento de los hongos cuando la concentración de glucosa fue igual o mayor de 20 g/l, posiblemente debido a adaptación osmótica de las células.

La esporulación de los hongos se dio más abundante cuando al medio 4, se le incluyó harina de trigo como sustrato, posiblemente porque los hongos utilizaron los carbohidratos de la harina como nutrientes.

Se superó la concentración de conidias cuando se utilizó el medio 4 respecto al cultivo tradicional en arroz, lo que representa que la fermentación bifásica sin sustrato sólido fue más rentable en cuanto a este parámetro.

Quedaron implementadas y estandarizadas las técnicas de determinación de concentración, germinación y pureza de hongos biocontroladores en el laboratorio de bioinsumos del Politécnico Colombiano JIC sede Rionegro.

Se recomienda que cuando se vierta el micelio crecido en medio líquido la altura de la columna sea de 5 mm. y no más baja porque se seca muy rápido y el hongo no alcanza a esporular.

Se recomienda estandarizar la fermentación bifásica sin sustrato sólido en el laboratorio para obtener cantidades de esporas que puedan ser formuladas, evaluadas en campo y comercializadas en un futuro cercano.

Se recomienda continuar con los cultivos en sustrato sólido en arroz mientras se estandariza el proceso o se obtienen nuevos resultados de investigación en los hongos, como, *M. anisopliae* que presentaron una pobre esporulación en los experimentos.

Se recomienda evaluar en condiciones de campo la supervivencia y patogenicidad de los hongos cultivados en los medios líquidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALVES, S. Fungos entomopatogenicos. p. 73-126. En: Alves, S. Controle microbiano de insectos. Sao Paulo (Brasil): Editora Manole, 1986.
- ANDERSON y ROBERTS, 1983. En: IV Seminario Nacional de Aconteceres Entomológicos. Memorias. Grupo de entomología Universidad Nacional De Colombia (GEUN). Medellín, 2001. p. 179-180.
- BADII, M. Ecología del control microbiano de insectos. En: Galán, L. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrados en *Bacillus thuringiensis*. México: Universidad de Sulinam de México, 1994. 101 p.
- BUSTILLO, A. Insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná (Colombia): Editorial Blanecor Ltda., 2008. p. 133-144
- BUSTILLO, A. y POSADA, E. El desarrollo y uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. En: XXIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología: Memorias. Cartagena (Colombia), 1996. p. 234- 253.
- BUSTILLO, A. Enfermedades de insectos causados por hongos. En: Enfermedades en insectos y posibilidades de uso en un programa de MIP en Colombia. Medellín, 1987 p. 11-21.
- CÁRDENAS y POSADA. 2001. En: Curso internacional teórico – práctico. Seminario sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café. Cenicafe Memorias, marzo de 2002. p. 9-10
- CIANCIO, A. y MUKERJI, K. Integrated Management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria. Editorial Springer Science, 2008. p. 303-317.
- DE BACH, P. El alcance del control biológico. En: De Bach, P. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México. Compañía Editorial Continental, S.A., 1969. p. 31-48.
- EVANS, H. Uso actual y potencial de los hongos entomopatógenos para el control biológico de artrópodos plagas. En: Tunja (Colombia) Manejo biológico de insectos-plagas. Material de estudio: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC, 1997. p. 225-228.
- EVANS, H. Uso actual y potencial de los hongos entomopatógenos para el control biológico de artrópodos plagas. En: SOCOLEN. Miscelánea Nº 21 (Julio 1991). P. 9-14.

GÓNGORA, C; MARÍN P. y BENAVIDES, P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Cenicafé. Avances Técnicos* 384 (Junio de 2009). Chinchiná, Caldas (Colombia). p. 1-7.

HALL, I. El uso de microorganismos en el control biológico. En: De Bach, p. *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. México: Compañía Editorial Continental, S.A., 1969. p. 715-737.

HOYOS, L. Hongos de importancia en el control biológico de insectos plagas. p. 170-183. En: *IV Seminario Nacional Aconteceres Entomológicos. Memorias*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín, 2001.

JIMÉNEZ, J. Uso de biocontroladores en la agricultura sostenible. En: *Productos biológicos Perkins Ltda.* Octubre, 2001.

JIMÉNEZ, J. El control microbiológico dentro del manejo integrado de insectos plagas. p. 7-31. En: *Control microbiano de insectos*. Santafé de Bogotá: CENIPALMA, 1992.

JIMÉNEZ, J. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. En: *Cenicafé*. Vol. 43, Nº 3.; (1992) p. 84-98.

LACEY, L. y KAYA, H. *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. California (USA): Editorial Springer, 2007. p. 1-6; 223-235.

LECUONA, R. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina: Talleres gráficos Mariano Mas., 1996. p. 35-56; 143-151; 196-203.

NICHOLLS, Clara. *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín (Colombia): Editorial universidad de Antioquia, 2008. p. 28-29; 109-128.

RODRÍGUEZ 1993. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. En: *Revista Colombiana de entomología*. Nº 1-2 (enero/junio 1994). p. 57-64.

RODRÍGUEZ, D. Uso de patógenos para el manejo de insectos plagas. En: *Colombia, Ciencia y Tecnología* (Abril-Junio 1990). P. 19-21.

RODRÍGUEZ, D. Hongos entomopatógenos. En: *Control biológico en Colombia. Historia, avances y proyecciones. Memorias SOCOLEN*. Palmira (Valle), 1989.

SAMSON, R., Evans, H. y Latge, J. 1988 Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer Verlag: Berlín. En: Manejo Biológico de Insectos. Material de estudio. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC, 1997.

SAMSON, R. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. En: Burgues, H. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. New York: Academic Press, 1981. 94p.

STEINHAUS, E. Enfermedades microbianas de los insectos. En: De Bach, P. Control biológico de plagas de insectos y malas hierbas. México. Compañía Editorial Continental, S.A., 1969. p. 607-645.

VÉLEZ, A. Memorias. p. 3. En: Seminario sobre patología de insectos. Medellín SOCOLEN. Comité Regional Antioquia, 1984.

VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E.; BUSTILLO, A. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. Cenicafé. Chinchiná, (Caldas), 1997. p. 4-15.

## **CIBERGRAFÍA**

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (Imagen en línea). Díaz, M., Flores, A., Rodríguez, S., De la Torre, M, 2006. Disponible en Internet: [www.scielo.org.ve/.../inci/v31n12/art06img01.gif](http://www.scielo.org.ve/.../inci/v31n12/art06img01.gif) (Citado 22-02-2010).

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. Diccionario de la lengua española Vigésima segunda edición (En línea), 2001. Disponible en Internet: [www.rae.es/rae](http://www.rae.es/rae). (citado 25-03-2010).

## **ANEXOS**

## ANEXO A

---

### Principales características de los patógenos de insectos

---

- Matan, reducen la reproducción, detienen el crecimiento o acortan la vida de las plagas.
- Son generalmente específicos de las plagas.
- Su efectividad puede depender de las condiciones ambientales y de la abundancia del hospedero.
- El grado de control de los patógenos que ocurren naturalmente es impredecible.
- Son relativamente lentos en su acción, por eso puede llevar varios días para alcanzar un control efectivo.
- Son ambientalmente seguros.

---

Tomado: (Nicholls, 2008).

## ANEXO B

---

### Especies de hongos entomopatógenos que se observan con frecuencia en el ecosistema cafetero colombiano.

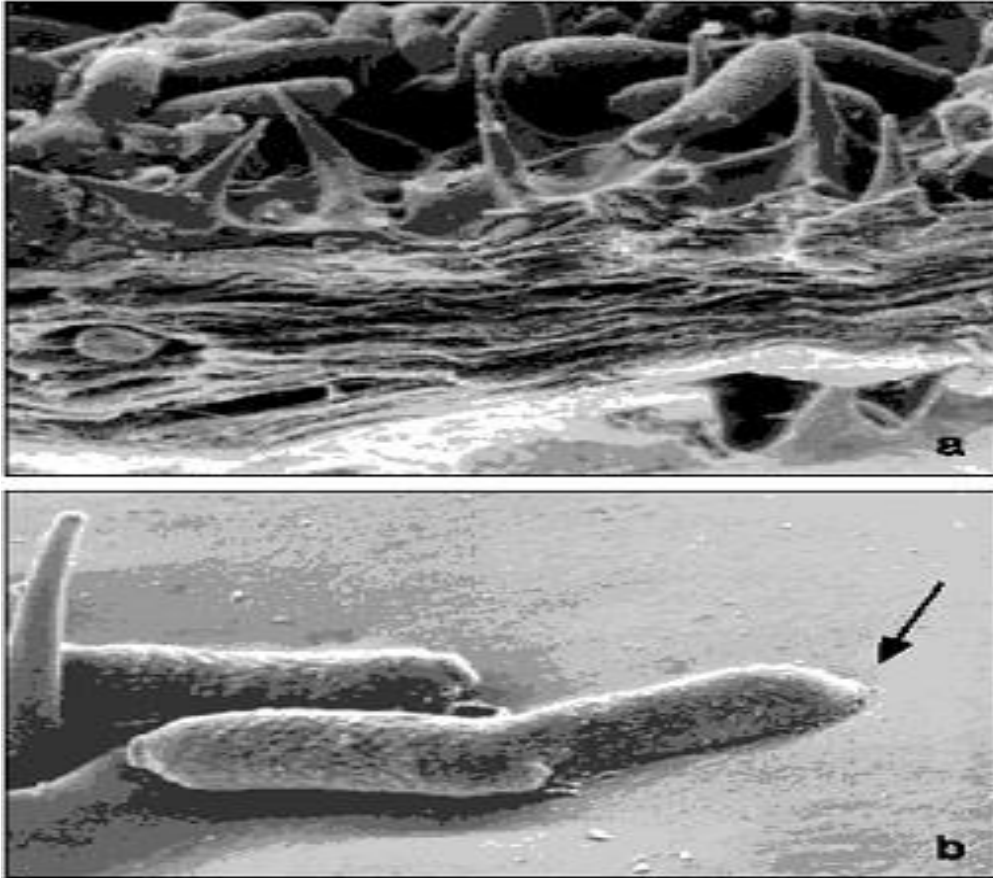
---

Hospedante		Enemigo natural
Orden	Especie	Especie
Homóptera	<i>Coccus viridis</i>	<i>Lecanicillium lecanii</i>
Homóptera	<i>Saissetia coffea</i>	<i>Lecanicillium lecanii</i>
Homóptera	<i>Ceroplastes sp.</i>	<i>Aschersonia sp.</i>
Homóptera	<i>Selenaspidus articulatus</i>	<i>Aschersonia sp.</i>
Homóptera	<i>Ischnaspi longirostris</i>	<i>Aschersonia sp.</i>
Homóptera	<i>Aleurocanthus woglumi</i>	<i>Aschersonia sp.</i>
Homóptera	<i>Aleurothrixus floccosus</i>	<i>Aschersonia sp.</i>
Lepidoptera	<i>Sibine fusca</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Lepidoptera	<i>Acraga morei</i>	<i>Paecilomyces sp.</i>
Lepidoptera	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Nomurea rileyi</i>
Lepidoptera	<i>Leucoptera coffeellum</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Hymenóptera	<i>Atta cephalotes</i>	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Beauveria brongniartii</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Metarhizium sp.</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Hirsutella sp.</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Fusarium sp.</i>
Coleóptera	<i>Hypothenemus hampei</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>

---

Tomado: (Cárdenas y Posada, 2001).

**ANEXO C. Penetración del hongo en el insecto**



**a.** Conidias sobre la cutícula de un insecto. **b.** Formación de apresorios  
Tomado: [www.scielo.org.ve](http://www.scielo.org.ve)

**ANEXO D. Ciclo biológico de los hongos entomopatógenos**



## ANEXO E

<b>Ordenes y Géneros de parásitos fungales necrótrofos que atacan insectos</b>		
<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Géneros</b>
<b>Chytridiomycetes</b>	Blastocladales	<i>Coelomomyces</i>
<b>Zygomycetes</b>	Entomophthorales	<i>Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Furia, Massospora, Pandora, Zoophthora, Neozygites, Conidiobolus</i>
<b>Ascomycota</b>	Hypocreales	<i>Cordyceps, Cordycepioideus, Ophiocordyceps, Torribiella, Gibellula, Pseudogibellula, Akanthomyces, Nomuraea, Hymenostilbe, Hirsutella, Paraisaria, Aspergillus, Ascosphaera.</i>
		<b>Estados anamorfos (géneros):</b>
		<i>Aschersonia, Beauveria, Fusarium, Hirsutella, Metarhizium, Nomuraea, Paecilomyces, Tolypocladium, Verticillium (Lecanicillium)</i>
	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
	Pleosporales	<i>Podonectria</i> <i>Entoderma</i>
Anamorfo no clasificado:		
<b>Oomycetes</b>	Lagenidiales	<i>Lagenidium</i>

Tomado: (Fuxa y Tanada, 1987, Kuno, Mulett y De Hernández, 1982 y Tanada y Kaya, 1993)

<b>Principales grupos de hongos biótrofos que atacan insectos</b>		
<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Género</b>
<b>Zygomycota</b>	Amoebidiales Asellariales Eccrinales Harpellales	
<b>Ascomycota</b>	Laboulbeniales	Taxa de afinidades desconocidas; <i>Termitaria, Laboulbeniopsis, Coreomycetopsis, Antennopsis, Muaiaria, Muriogone, Chantransiopsis, Hormiscioideus</i>
<b>Basidiomycota</b>	Uredinomycetes Septobasidiales	<i>Septobasidium, Uredinella</i>

Tomado: (Kuno, Mulett y De Hernández, 1982 y Tanada y Kaya, 1993).

## ANEXO F

### Cultivos en Colombia en los cuales se utilizan comercialmente los hongos entomopatógenos

Cultivos	Hongo entomopatógeno	Plaga a Controlar
Café	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hormigas
Maíz-sorgo	<i>Nomuraea rileyi</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Tomate	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Heliothis</i> sp.
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Lepidopteros, otras
	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Moscas blancas, otras
Arroz	<i>Beauveria bassiana</i>	Chinches
Pastos	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Collaria</i> sp.
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Zulia</i> sp.
Palma Africana	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Stenoma</i> sp.
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Leptopharsa gibbicarina</i>
Flores	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Phylophaga</i> sp.
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Ancognata</i> sp.

Tomado: Productos Biológicos Perkins Ltda. y Coinbiol Ltda.

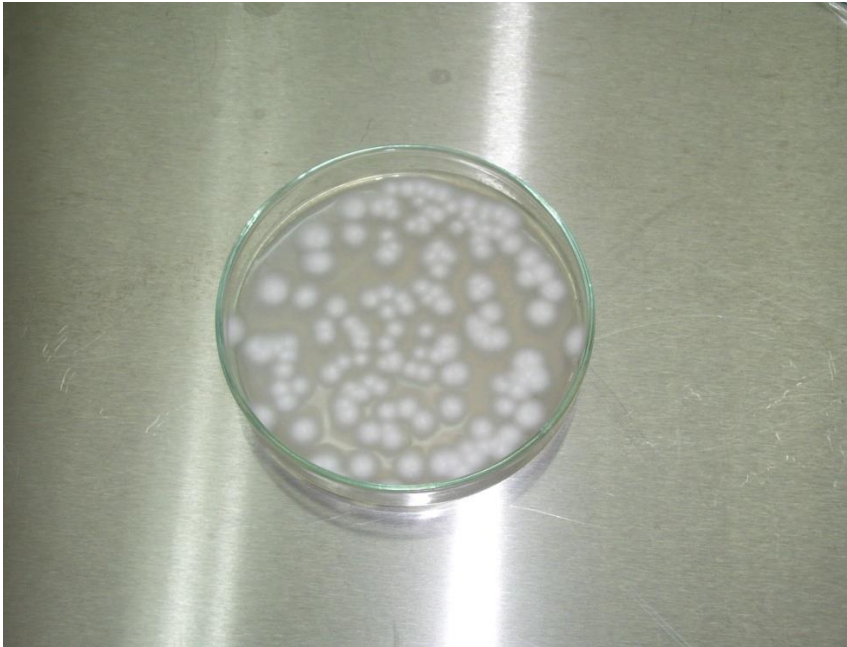
## ANEXO G

### Productos comerciales de *Beauveria bassiana* registrados ante el ICA.

Nombre comercial	Nº de Registro ICA	Empresa productora
ADRAL WP	00392	Bio-Crop
AGRONOVA	4366	Live System Technology S.A.
BASSIANIL	2273	Biocontrol
BAUBASSIL	001558	Fungicol
BOTANIGARD		
22WP	4166	Laboratorios Laverlam
BOVETROPICO		
WP	5860	Soluciones Microbianas del tropic
BROCARIL WP	3412	Laboratorios Laverlam
MUSCARDIN	5673	Bioecológicos Ltda.
MYCOTROL SE	4167	Laboratorios Laverlam
MICOSIS	6051	Bioprotección

Tomado: Cenicafé. Gongora; Marín y Benavides (2009).

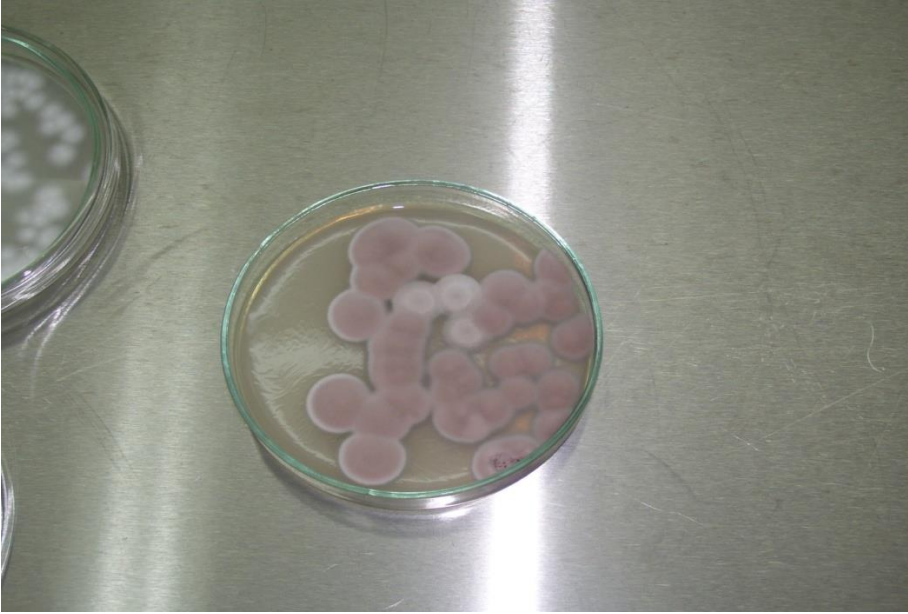
**ANEXO H. Cepa de *Beauveria bassiana***



**ANEXO I. Cepa de *Metarhizium anisopliae***



**ANEXO J. Cepa de *Paecilomyces lilacinus*. Nótese las colonias blancas contaminantes.**



**ANEXO K. Cepas en incubación**



**ANEXO L. Manipulación de hongos biocontroladores en el laboratorio**



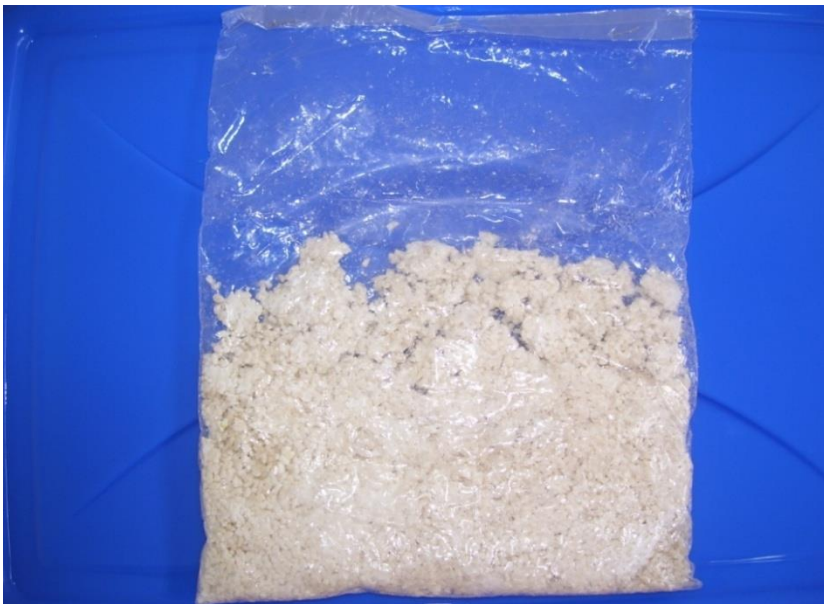
**ANEXO M. Cultivos de hongos biocontroladores en fase líquida.**



**ANEXO N. Agitador orbital para cultivo de hongos biocontroladores en fase líquida**



**ANEXO O. Bolsas de polietileno con un cultivo de *B. bassiana* con arroz como sustrato**



**ANEXO P. Procedimiento de diluciones seriadas para  
manejo de las cepas en el laboratorio**



**ANEXO Q. Resultados de análisis estadístico para el parámetro concentración**

<b>CONCENTRACIÓN</b>						
Tukey HSD test; variable CONCENTR (new.sta)						
Homogeneous Groups, alpha=,05						
MAIN EFFECT:						
TRATAMIE						
Concentración						
		Mean	B	A		
m1	Ma {1}	1,9E+07	Xxxx			
m3	Ma {2}	2,8E+07	Xxxx			
m3	Bb {3}	3,6E+07	Xxxx			
m3	PI {4}	2,1E+08	Xxxx			
m4	Ma {5}	3,2E+08	Xxxx			
m5	Ma {8}	3,6E+09	Xxxx			
m5	PI {10}	6,4E+09	Xxxx			
m5	Bb {9}	1,2E+10	Xxxx			
m4	Bb {6}	6,5E+10		xxxx		
m4	PI {7}	7,0E+10		xxxx		
Summary of all Effects; design: (new.sta)						
1-TRATAMIE						
		Df	MS	df	MS	
		Effect	Effect	Error	Error	F p-level
1		9	2,2681E+21	20	8,7849E+19	25,8184891 4,1161E-09

## ANEXO R. Resultados de análisis estadístico para el parámetro germinación

<b>GERMINACIÓN</b>						
Tukey HSD test; variable VIABILID (new.sta)						
Homogeneous Groups, alpha=,05						
MAIN EFFECT: TRATAMIE						
Germinación						
		Mean	B	A		
m1	Ma	{1}	75,3333359	Xxxx		
m3	Ma	{2}	95		xxxx	
m4	Ma	{5}	95		xxxx	
m5	Bb	{9}	95		xxxx	
m3	Bb	{3}	95,6666641		xxxx	
m4	Bb	{6}	95,6666641		xxxx	
m5	Ma	{8}	95,6666641		xxxx	
m5	Pl	{10}	96,3333359		xxxx	
m3	Pl	{4}	96,6666641		xxxx	
m4	Pl	{7}	96,6666641		xxxx	
Summary of all Effects; design: (new.sta)						
1-TRATAMIE						
		Df	MS	df	MS	
		Effect	Effect	Error	Error	F
						p-level
1		9	126,18148	20	14,3333333	8,80335903
						2,9859E-05