

Evaluación de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* producidas en dos medios diferentes y su eficacia en el control sobre adultos de *Cosmopolites sordidus* (Picudo negro del plátano)

Jerónimo Jaramillo Ramírez

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* producidas en dos medios diferentes y su eficacia en el control sobre adultos de *Cosmopolites sordidus* (Picudo negro del plátano)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jerónimo Jaramillo Ramírez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Evaluación de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* producidas en dos medios diferentes y su eficacia en el control sobre adultos de *Cosmopolites sordidus* (Picudo negro del plátano)

Jerónimo Jaramillo Ramírez

Resumen. Los hongos entomopatógenos son microorganismos utilizados para el control biológico de plagas agrícolas y forestales. El picudo negro es la plaga insectil más importante del banano y el plátano. Los objetivos del estudio fueron evaluar cuatro cepas de *B. bassiana* en dos medios de cultivo, y determinar la eficacia de cuatro cepas de *B. bassiana* para el control de adultos de *Cosmopolites sordidus*. Para el ensayo de producción, se emplearon los medios de arroz y maíz quebrado los cuales fueron esterilizados en bolsas de 300 gramos con 75 mL de agua destilada. Una vez frío el medio, se inoculó con 20 mL de una solución de 1×10^7 esporas/mL. Se incubó por siete días y se secó por siete días para luego cosechar las esporas. Se midió el rendimiento en gramos de esporas por kilogramo del medio, el porcentaje de viabilidad y concentración de esporas por gramo. Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de cuatro cepas por dos medios con cuatro repeticiones. Para el ensayo de patogenicidad se utilizó un diseño completamente al azar utilizando cuatro cepas con tres repeticiones. Cada unidad experimental se inoculó con una concentración de 1.78×10^{11} conidias/ha. El mayor rendimiento se obtuvo en el medio arroz. La cepa Zamorano y el medio arroz obtuvieron el mayor rendimiento, 17.2 g/kg. La cepa CATIE-415 obtuvo el mayor control del picudo con 46% de mortalidad en condiciones de laboratorio, pero no fue significativamente diferente a la cepa GHA.

Palabras clave: Concentración, control biológico, mortalidad, viabilidad.

Abstract. Entomopathogenic fungi are microorganisms used as agents of biological control for agriculture and forest pests. The banana weevil is the most important pest for banana and plantain. The objectives of this study were the evaluation of four strains of *B. bassiana* in two culture media and determine the effectiveness of four *B. bassiana* strains in the control of *Cosmopolites sordidus* adults. To establish the production the medium were sterilized in boxes with 300 grams of rice and split corn with 75 mL of water, when the medium was cold it was inoculated with 20 mL of 1×10^7 spores/mL. It was incubated for seven days and dried for seven days and then harvested the spores. The measured variables were, yield in grams of spores per kilogram of medium, the % of viability and spore concentration per gram. It was used a completely random design with a factorial arrangement of four strains and two means with four repetitions. For the pathogenicity test it was used completely random design with four strains with three repetitions. Each experimental unit was inoculated with a concentration of 1.78×10^{11} conidia / ha. The highest yield was the medium rice and it was significantly different from the medium corn. Zamorano strain and the medium rice had the highest yield with 17.2 g/kg. The CATIE-415 strain obtained the highest mortality of banana weevil with 46% mortality, under controlled conditions but was not significantly different from the GHA strain.

Key words: Biocontrol, concentration, mortality and viability.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	vi
Índice de Cuadros.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	9
5. RECOMENDACIONES.....	10
6. LITERATURA CITADA	11

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Efecto de las cepas, el medio y la interacción de ambas sobre las variables evaluadas, Zamorano, 2019.....	6
2. Rendimiento promedio en gramos de esporas por kilogramo de sustrato colonizado de <i>B. bassiana</i> , Zamorano, 2019.....	7
3. Rendimiento promedio de las cuatro cepas en dos diferentes medios de producción, Zamorano, 2019	7
4. Porcentaje de mortalidad de <i>C. sordidus</i> adultos a una concentración de 1.7×10^{11} esporas/g <i>B. bassiana</i> , Zamorano, 2019.....	8

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos son organismos capaces de controlar plagas insectiles mediante diferentes mecanismos. Hoy en día existen más de 750 especies conocidas, entre los géneros más comunes se encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Ascherosonia*, *Entomophthora*, entre otros (Motta y Murcia 2011).

Uno de los organismos entomopatógenos más usado como controlador biológico, es el hongo *Beauveria bassiana*. Éste es un hongo perteneciente a la clase Deuteromycetes y está entre los llamados hongos superiores. El proceso de ataque o infección del hongo está dividido en tres etapas: primero las esporas se pegan a la cutícula del insecto segundo las conidias penetran la cutícula del insecto haciendo uso de mecanismos físicos y químicos y tercero, el hongo se desarrolla dentro del insecto causándole la muerte para posteriormente germinar (Botero *et al.* 2009).

Una de las problemáticas más importante para la utilización de hongos entomopatógenos es su producción masiva en donde se busca un crecimiento rápido, alta virulencia, mantener la viabilidad, altos porcentajes de esporulación, entre otros. Las mayores limitantes para lograr estos objetivos son: el medio a usar y el método de cultivo (Gandarilla-Pachenco *et al.* 2013). Los hongos necesitan de un medio rico en carbohidratos y azúcares disponibles, que tenga suficiente espacio entre sus partículas para brindarle oxígeno y sobre todo que sea económicamente rentable para una producción a gran escala.

Cosmopolites sordidus es la plaga insectil que más afecta los cultivos de plátano y banano en los países del trópico y subtrópico. El estadio que daña a la planta es el larval, el cual realiza galerías en el cormo, afectado su sistema radicular. Estas heridas se pueden ver comprometidas por hongos o bacterias que generan pérdidas en producción y pueden ocasionar la muerte de la planta (Muñoz Murgueitio 2001). Los adultos tienen hábitos nocturnos, pueden llegar a vivir de uno a cuatro años y tienen la capacidad de pasar meses sin alimentarse. La hembra realiza perforaciones, utilizando su aparato bucal, cerca del rizoma de la planta para posteriormente ovopositar. Las larvas surgen a los cinco a siete días después de la postura.

El uso de hongos entomopatógenos para controlar el picudo negro del plátano es una excelente herramienta ya que se ha reportado controles del 100% (Ubillina López 2007), además este microorganismo puede llegar a establecerse en los cultivos y generar un control permanente de la plaga. Debido a estos antecedentes los objetivos del estudio fueron:

- Evaluar la producción de cuatro cepas de *B. bassiana* en dos diferentes medios de producción (arroz y maíz).
- Determinar la efectividad de cuatro cepas de *B. bassiana* para el control de adultos de *C. sordidus* aplicados en condiciones de laboratorio a una misma concentración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se llevó a cabo en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano a 32 km de Tegucigalpa, con una temperatura promedio de 24 °C, a una altura de 782 msnm y una precipitación promedio de 1023 mm. El ensayo se realizó en el laboratorio de Control Biológico. El experimento se elaboró de mayo a septiembre del 2019.

Estudio 1. Producción de cepas.

Preparación del inóculo. Se inocularon 10 platos Petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA) por cepa, y se dejaron en incubación por 10 días para verificar el desarrollo del hongo en el medio de cultivo. Una vez comprobado el buen crecimiento del hongo y sin presencia visual de contaminación, se procedió a la preparación del inóculo de producción en botellas de vidrio. Lo cual consistió en colocar dentro de una botella previamente esterilizada, 100 g de arroz y 30 mL de agua destilada y un cuarto del PDA con el hongo desarrollado, éstas se incubaron durante siete días en condiciones controladas de temperatura (28 °C) y con una humedad relativa del 60 - 80%.

Preparación del sustrato. Para este experimento se utilizaron dos sustratos como medios de producción; arroz blanco y maíz amarillo. En el caso del arroz, no se le hizo ningún lavado o tratamiento previo. En el caso del maíz, se utilizó grano quebrado en un molino eléctrico. Posteriormente se tamizó el maíz quebrado, para eliminar residuos indeseados y luego se lavó con abundante agua para eliminar impurezas. Una vez limpio, el maíz se dejó remojando en agua con cloro al 0.5%, por 12 horas para poder ser utilizado al siguiente día.

Inoculación del sustrato. Se colocaron 300 g de arroz blanco y 75 mL de agua destilada en bolsas autoclavables y se esterilizó en la autoclave por 50 minutos a una temperatura de 121 °C. El mismo proceso se realizó con el maíz quebrado. Utilizando la matriz de siembra se obtuvo una suspensión de las esporas desarrolladas sobre el arroz en las botellas, utilizando agua destilada estéril hasta obtener una concentración no menor a 1×10^8 esporas/mL, posteriormente se agregó 20 mL de ese inóculo a cada bolsa con el sustrato estéril, se mezcló hasta que el inóculo quedó distribuido en todo el medio.

Incubación y secado. Las bolsas inoculadas se colocaron en el cuarto de incubación, durante siete días, a una temperatura promedio de 28 °C con una humedad relativa de 60-80%, con el objetivo de que el hongo colonizara el medio y empezara su proceso de esporulación. Pasado el tiempo de incubación las bolsas que contenían el medio colonizado fueron extraídas y llevadas al cuarto de secado a donde se retiró de la bolsa el sustrato con el hongo desarrollado y se extendió sobre bandejas cubiertas con papel manila con el fin de

extraer la humedad del medio, para lo cual se dejó por siete días a una temperatura promedio de 28 °C hasta alcanzar una humedad relativa de 8%.

Tamizado. Una vez reducida la humedad del grano a 8% se procedió a procesar por un tamiz de 80 mesh, con el objetivo de separar las esporas del medio. Una vez separadas las esporas de su respectivo sustrato, se pesaron para medir su rendimiento y se guardaron en una refrigeradora para su posterior control de calidad.

Control de calidad. Se realizó la evaluación de la concentración de esporas por gramo y el porcentaje de viabilidad del producto cosechado. Para la concentración de esporas se pesó un gramo de muestra para cada cepa. El proceso consiste en colocar en un Erlenmeyer 100 mL de agua estéril al 0.04% de TweenTM80, de la solución stock se tomó un mL y se procedió a realizar tres diluciones seriadas, en tubos de ensayo que contenían 9 mL de agua, a partir de la última dilución, se tomaron 20 µL y se colocaron en una cámara de Neubauer, en donde se contó las cantidad de esporas por cada cuarto de la cámara de Neubauer, se hizo un promedio de las esporas contadas y se multiplicó por cada factor de dilución, por la solución madre, 100 mL, y por 10,000, que es el valor constante de la cámara de Neubauer.

Para la evaluación de viabilidad, se tomó 100 µL, a partir de la tercera dilución, de la muestra de la prueba de concentración de esporas, y se sembró en un plato Petri, que contenía PDA. Las placas fueron incubadas por 16 horas, con el fin de que las esporas germinaran y se seleccionaron cuatro puntos al azar de la placa para su evaluación. Se contaron las esporas viables y las no viables, tomando como criterio que una espora viable, pasando el tiempo de incubación, debía de estar elongada al menos la mitad del diámetro de la espora original y las no viables eran aquellas que no dieron lugar al desarrollo de alguna estructura. Luego se utilizó la fórmula 1 para el cálculo del porcentaje de viabilidad de las muestras procesadas:

$$\%V = \left(\frac{\text{viables}}{\text{total de esporas}} \right) \times 100 \quad [1]$$

Donde: Total de esporas es igual a viables + no viables.

Diseño experimental y análisis estadístico. El experimento se realizó con un Diseño Completamente al Azar (DCA) y un arreglo factorial de cuatro cepas en dos medios que fueron repetidas cuatro veces para un total de 32 unidades experimentales. Se utilizó un análisis de varianza GLM, con una separación de medias por Duncan ($P \leq 0.05$) y LMEANS para la interacción de los medios y las cepas. Los resultados se analizaron haciendo uso del programa estadístico “Statical Analysis System” (SAS[®]). A los datos de concentración de esporas se les aplicó logaritmo natural más uno, y a los de viabilidad se aplicó la función arcoseno, con el objetivo de uniformizar los datos.

Estudio 2. Evaluación de efectividad de las cuatro cepas.

El estudio se realizó para determinar cuál de las cuatro cepas evaluadas tiene una mayor patogenicidad sobre el adulto del picudo del plátano, *C. sordidus*. Se colectaron adultos del picudo de una plantación vieja de plátano ubicada en el lote de producción de frutales de Zona 2, ubicada en la Escuela Agrícola Panamericana. Los picudos se capturaron por el método de trampa de disco y fueron transportados al Laboratorio de Control Biológico.

Desinfección. Los picudos recolectados se desinfectaron, sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.01% durante 30 segundos, luego se colocaron en un plato Petri con agua destilada estéril, durante otros 30 segundos para eliminar cualquier residuo de hipoclorito de sodio.

Inoculación y tratamientos. Los picudos desinfectados fueron sumergidos por 30 segundos en una solución de 200 mL de agua estéril, con 40 μ L de BIONEX (adherente) y 1.7×10^{11} esporas/g de *B. bassiana*. Posteriormente se colocaron los picudos en una cámara húmeda, la cual consistía en un plato Petri con papel toalla en su base y algodón húmedo en sus bordes, a fin de proporcionar condiciones de humedad para el desarrollo del hongo. Se colocaron cinco picudos por cámara y se establecieron tres repeticiones.

Las cámaras húmedas se dejaron dentro de una incubadora a una temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y con una humedad relativa de 65 - 80%. Se dejaron incubar por 14 días para luego evaluar el porcentaje de mortalidad de *C. sordidus*.

Control de calidad. Por las tres repeticiones de la inoculación del insecto, se tomó una muestra de la dosis, 1.7×10^{11} esporas/g, con el fin de asegurar la calidad de las esporas del ensayo número dos, en donde se midió la concentración y porcentaje de viabilidad de la dosis aplicada.

Diseño experimental y análisis estadístico. El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, DCA con cuatro tratamientos y un testigo. Todos los tratamientos fueron evaluados a la misma concentración. La separación de medias se hizo con la prueba Duncan, con una diferencia significativa de ($P \leq 0.05$). Los resultados se analizaron haciendo uso del programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS[®]) versión 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio 1. Evaluación de 2 medios de producción y cuatro cepas de *B. bassiana*.

Al evaluar los factores se determinó que la variable rendimiento presentó diferencia ($P \leq 0.05$), tanto para los factores medio como para la interacción entre la cepa y medio (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de las cepas, el medio y la interacción de ambas sobre las variables evaluadas, Zamorano, 2019.

Factores	#Esporas /g	Viabilidad (%)	Rendimiento (g/kg)
Cepa	ns	ns	ns
Medio	ns	ns	***
Cepa \times Medio	ns	ns	***

***: Existieron diferencias ($P \leq 0.05$)

ns: No existieron diferencias ($P > 0.05$)

Los resultados al evaluar el medio de cultivo para la variable rendimiento indican que se obtuvo el mayor rendimiento de esporas en el medio de arroz con promedio de 11.8 g/kg de arroz, siendo diferente ($P \leq 0.05$) al medio maíz con 5.2 g/kg (Cuadro 2). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Rodríguez *et al.* (2017) en donde encontró mayor rendimiento de número de conidios por gramo en el sustrato de arroz versus maíz. De igual forma el rendimiento de *B. bassiana* dependerá mucho del tipo del sustrato donde crezca, ya que éste le brindará diferentes nutrientes. En el caso del arroz se tiene un mayor porcentaje de carbohidratos y azúcares disponibles que influenciarán en un mayor rendimiento respecto al maíz. De igual manera el arroz tiene una mayor área superficial en donde el hongo se puede desarrollar debido a que los componentes del pericarpio son más asimilables para las enzimas de *B. bassiana*. En cambio, el maíz tiene un pericarpio muy sólido lo cual dificulta el desarrollo óptimo del hongo.

Cuadro 2. Rendimiento promedio en gramos de esporas por kilogramo de sustrato colonizado de *B. bassiana*, Zamorano, 2019.

Sustrato	Rendimiento (g/kg)
Arroz	11.8 ^a
Maíz	5.2 ^b
Probabilidad	0.0001
R ²	0.781396
C.V.	28.66541

ab=Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

En el estudio no se encontró diferencia ($P > 0.05$) para las cepas evaluadas por lo cual todas las cepas producen igual independientemente del medio utilizado, se encontró interacción entre la cepa y el medio. La cepa Zamorano producida en el medio Arroz produjo el mayor rendimiento (17.2 g/kg) siendo diferente ($P \leq 0.05$) que el resto de los tratamientos. La cepa GHA produjo los menores rendimientos, pero estos no fueron diferentes ($P > 0.05$) de la cepa CATIE-415 en arroz. Las cuatro cepas tuvieron el mismo rendimiento sin diferencia ($P > 0.05$) en el medio maíz. Todas las cepas en el medio maíz obtuvieron los menores rendimientos. Villalba *et al.* 2009 también señalan el arroz como el mejor medio de producción versus el maíz (Cuadro3).

Cuadro 3. Rendimiento promedio de cuatro cepas producidas en dos diferentes medios de producción, Zamorano, 2019.

Tratamiento	Medio	Rendimiento (g/kg)
Zamorano	Arroz	17.2 ^a
El Salvador	Arroz	12.8 ^b
CATIE-415	Arroz	10.1 ^{bc}
GHA	Arroz	9.1 ^c
El Salvador	Maíz	6.5 ^{cd}
CATIE-415	Maíz	6.4 ^{cd}
GHA	Maíz	4.8 ^d
Zamorano	Maíz	3.4 ^d
Probabilidad		0.0001
R ²		0.781396
C.V.		28.66541

abcd=Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Estudio 2. Evaluación de efectividad de las cuatro cepas.

En los resultados del estudio de eficacia de cuatro cepas de *B. bassiana* sobre adultos de *C. sordidus* las cepas CATIE-415 y GHA obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad con 46% y 33% respectivamente, sin presentar diferencias ($P > 0.05$) entre estas (Cuadro 4). Sin embargo, la cepa GHA no difiere ($P > 0.05$) de las cepas Zamorano y El Salvador. Todas las cepas presentaron una mayor mortalidad respecto al testigo. Estos resultados se pueden atribuir a que la virulencia de la cepa se ve relacionada en el lugar en donde fue aislada, tipo de medio, hospedero, y los mecanismos de defensa que pueda tener el insecto sobre el hongo (Rubio y Fereres 2005). Otro estudio realizado por (Barrios 1992) infiere que las cepas que se encuentren separadas geográficamente tienen diferente virulencia, lo que concuerda con el presente estudio, en donde cada cepa evaluada proviene de un país diferente.

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de *C. sordidus* adultos a una concentración de 1.7×10^{11} esporas/g de *B. bassiana*, Zamorano, 2019

Cepa	% de mortalidad
CATIE-415	46.6 ^a
GHA	33.3 ^{ab}
Zamorano	13.3 ^b
El Salvador	13.3 ^b
Testigo	0 ^c
Probabilidad	0.0027
R ²	0.87
C.V.	28.1

abc=Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- Los mayores rendimientos se obtuvieron con la cepa Zamorano producida en el medio de cultivo arroz.
- El sustrato arroz presentó los mayores rendimientos en g/kg en comparación con el maíz, independientemente de las cepas.
- La cepa de *B. bassiana* CATIE-415 a la dosis 1.7×10^{11} esporas/g fue la que tuvo un mayor control del adulto de *C. sordidus*.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros sustratos de bajo costo para la producción de *B. bassiana*.
- Evaluar el tamaño de las esporas producidas con diferentes sustratos.
- Evaluar estas mismas cepas de *B. bassiana* para el control de larvas de *C. sordidus*.

6. LITERATURA CITADA

- Barrios M. 1992. Producción y virulencia de algunas cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Contra la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari).
- Botero C, Marín P, Machado P. 2009. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* Como controlador biológico de la broca del café [consultado 2019 mayo 3].<http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/346/1/avt0384.pdf>
- Gandarilla L, Galán L, Arévalo N, Santos M, Quintero I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Hypocreales: Cordycipitaceae provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3): 255-266.
- Ubillina López PF. 2007 Control de Picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) con barrera de polietileno y Bazam (*Beauveria bassiana*) en plátano para condiciones de Zamorano [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 21p.
- Motta P, Murcia B. 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2): 77-90.
- Muñoz Murgueitio MF. 2001. Estudios de población, monitoreo y control del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*, Germar) en el cultivo del plátano (Musa AAB) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 43p.
- Rodríguez-Gómez A, Gandarilla-Pacheco FL, Maldonado-Blanco MG, Quintero-Zapata I, Morales-Ramos LH, Alvarez JH, Elías-Santos M. 2017. Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *beauveria bassiana* (bals.) vuill.hypocreales: Cordycipitaceae en cultivo bifásico. *Interciencia*, 42(11): 739-743.
- Rubio V, Fereres A. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. [internet]. [consultado en el 03 de jun. de 2019]. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres%2c%202005.pdf>
- Villalba P, Grillo H, Cupull R. 2009 Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. *Centro Agrícola*, 36(4): 25-32.