

REPRODUCCIÓN DE DOS CEPAS NATIVAS DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS* (WIZE) BROWN & SMITH, SOBRE DIFERENTES SOPORTES LÍQUIDOS Y SÓLIDOS

Aidanet Carr, Orestes Elósegui y Noris Bel Padrón

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a B y 5a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: acarr@inisav.cu

RESUMEN

Existen cultivos de gran importancia económica en nuestro país que son afectados por diferentes plagas, siendo *Bemisia tabaci* una de ellas, por lo que se ha realizado este trabajo con el objetivo de evaluar la posibilidad de reproducción de las cepas Pz-5 y LBPf-4 del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* sobre diferentes sustratos, tanto por vía líquida como sólida, analizando sus controles de calidad. Los resultados mostraron la posibilidad de utilizar la cabecilla de arroz como mejor soporte sólido para la propagación de este microorganismo, donde se alcanzan concentraciones de $8-9 \times 10^8$ con/g.e., mientras que la combinación de levadura torula al 1% y melaza al 2% resultó superior y significativamente diferente a los otros medios ensayados, alcanzando un título de 10^8 esporas/mL.

Palabras clave: *Bemisia tabaci*, *Paecilomyces fumosoroseus*, reproducción

ABSTRACT

There is economic important crops in our country affected by different pests, being *Bemisia tabaci* one of them. That is why this work was made with the objective of evaluate reproduction possibility of Pz-5 and LBPf-4 strain of entomopathogenous fungus *Paecilomyces fumosoroseus* on different substrates by liquid and solid way, analysing its quality control. Results showed possibility to use cabecilla de arroz as better solid support for propagation of this microorganism, where are reached concentrations of $8-9 \times 10^8$ con/g.e. Combination of leavening torula at 1% and molasses at 2% has been superior and significantly different to other medium assayed, reaching a title of 10^8 spores/mL.

Key words: *Bemisia tabaci*, *Paecilomyces fumosoroseus*, reproduction

INTRODUCCIÓN

A escala mundial se está trabajando con estos hongos entomopatógenos. En China más de diez millones de hectáreas forestales son protegidas por métodos biológicos. En América Latina, específicamente en Brasil, 160 000 ha son tratadas con mico-insecticidas [Antia-Lodoño *et al.*, 1992].

En Cuba desde la década del ochenta se crearon en cada provincia los primeros laboratorios de producción. En la actualidad existen 220 Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE), con una capacidad de producción de más de 20 t anuales, todos atendidos por el sistema estatal de sanidad vegetal de Cuba. Estos biopreparados protegieron alrededor de 572 000 ha en toda la isla durante 1999.

En nuestro país existen numerosos cultivos que son atacados por diferentes especies de insectos que provocan graves daños en la economía del país. Estas plagas son reguladas por algunos hongos entomopatógenos, entre ellos *P. fumosoroseus*. Entre las más frecuentes está *Bemisia*

tabaci (Gennadius), conocida con el nombre de mosca blanca, la cual ataca diversos cultivos como los cítricos y el frijol. Los más afectados son la frutabomba, el tomate, el ají, el pimiento, la yuca y los cafetos [Vidal, 1998], entre otros, y el *Thrips palmi* Karni, detectado en noviembre de 1996 y que afecta seriamente a varios cultivos de importancia económica [CNSV, 2000].

Constituye una necesidad actual y económica para el país la búsqueda de nuevas alternativas de microorganismos que amplíen las capacidades productivas de los CREE y el rango de plagas que se han de combatir por estos métodos, así como perfeccionar las tecnologías existentes que permitan reducir los insumos en divisas, diversificar las materias primas a partir de las disponibilidades de cada territorio, incrementar la calidad de los biopreparados que se obtienen y perfeccionar el sistema de aseguramiento de la calidad de la producción.

Al tener en cuenta que los hongos entomopatógenos constituyen uno de los principales grupos de microorganismos

que se utilizan en el país para el control biológico, se proponen los siguientes objetivos para este trabajo: estudiar el comportamiento del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* sobre diferentes soportes sólidos y líquidos, así como su calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron dos cepas nativas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* denominados Pz-5 y LBPf-4, probándose su desarrollo en diferentes sustratos sólidos y líquidos.

Propagación en soporte sólido

Se emplearon en este ensayo frascos de 500 mL de capacidad con los siguientes sustratos: cabecilla de arroz (100 g), cáscara de arroz (100 g), cabecilla de arroz 50 g + cáscara de arroz 50 g.

La esterilización se realizó durante 40 minutos a 121°C. El pH se ajustó entre 6,2-6,5. Los frascos se inocularon con 10 mL de una suspensión 10^7 con/mL del hongo e incubados durante 10 días de forma estática a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se determinó la concentración de conidios en el soporte sólido utilizando la cámara de Neubauer.

La viabilidad de las esporas se realizó en portaobjetos con medio PDA inoculadas con una suspensión del hongo de 10^6 con/mL, e incubadas en cámara húmeda durante 16-18 h. El porcentaje de conidios fue determinado por conteo al microscopio óptico (40X).

También se realizaron observaciones al microscopio óptico del crecimiento del hongo cada día desde las 24 h hasta los diez días.

Para determinar la virulencia se aplicó el biopreparado a la dilución de 10^8 con/mL sobre 50 moscas blancas u se calculó en forma de por ciento.

Cultivo del hongo en medio líquido estático

Se utilizaron frascos de 500 mL de capacidad con 100 mL de los siguientes medios: melaza 20 g/L + levadura torula 10 g/L, cabecilla de arroz 20 g/L + azúcar 10 g/L + CaCO_3 1g/L, harina de maíz 20 g/L + azúcar 10g/L.

Para la confección del primer medio, la levadura torula con el agua se esteriliza a 1,5 atm durante 40 min. Posteriormente se le añade el otro producto (melaza).

El pH de los medios se ajustó entre 6,2-6,5. La esterilización se realizó a 121°C durante 20 min. Se inocularon con 1 mL de una suspensión de 10^7 con/mL. La incubación se realizó durante 10 días a temperaturas de 25°C .

Las experiencias anteriores fueron evaluadas por conteos de conidios en cámara de Neubauer y se montaron cuatro réplicas por variantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propagación en soporte sólido, comportamiento del crecimiento, viabilidad y virulencia

En las tres variantes probadas la cabecilla de arroz resultó ser la que obtuvo mejores valores de concentración con títulos entre $8-9 \times 10^8$ con/g, y la esporulación fue completa a las 72 h, aunque entre LBPf-4 y Pz-5 existieron diferencias significativas, no siendo así para la variante de la cáscara de arroz + cabecilla de arroz, en la cual no hubo diferencias (Fig. 1).

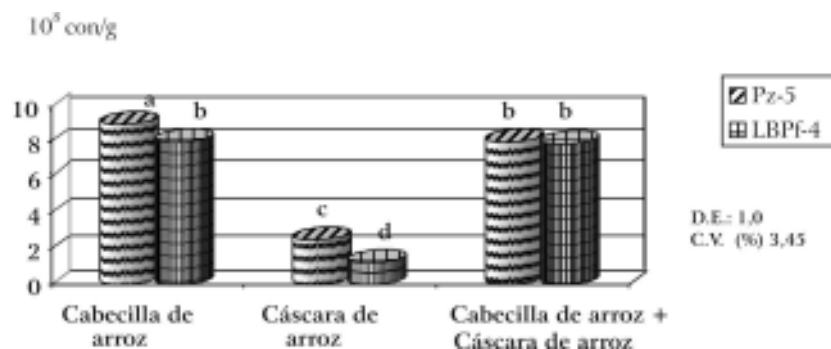


Figura 1. Evaluación de diferentes sustratos sólidos para la reproducción de Pz-5 y LBPf-4 en soporte sólido.

Los resultados corroboran lo expresado por López (1995), quien reprodujo *P. lilacinus* sobre cabecilla de arroz, y obtuvo títulos de 9×10^8 con/mL, y coinciden con los resultados de reducciones sobre cabecilla de arroz que realizan en el CREE San Juan de la provin-

cia de Pinar del Río, donde reproducen *P. fumosoroseus* y obtienen títulos de $6,7 \times 10^8$ con/mL [comunicación personal], al igual que Fonseca *et al.* (1995), que obtuvieron en los medios cabecilla de arroz, cáscara de arroz con maleza macerada, cáscara de arroz con cabecilla y

cáscara con polvo de arroz y maleza los mayores valores de crecimiento y esporulación en la reproducción del hongo *Verticillium lecanii*, para el control de *Coccus viridis* Green en café.

Gómez-Carneiro (1992) utilizó la reproducción bifásica primero en medio líquido de arroz, después arroz estéril en bolsas de polipropileno con resultados muy favorables [citado por López, 1995].

Los resultados con cáscara de arroz en los que se obtuvieron títulos entre $1-8 \times 10^8$ con/g, indican que mientras dispongamos de los sustratos cabecilla de arroz y cabecilla + cáscara de arroz, sean los antes mencionados los utilizados, si no, tenerlo en cuenta como una alternativa de producción, ya que para el caso de la cáscara de arroz su esporulación resultó ser más lenta y mucho más para el aislado LBPf-4.

Los cambios morfofisiológicos del crecimiento del hongo en el medio sólido, se evidenciaron porque la superficie de las partículas de cabecilla de arroz son cubiertas a las 48 h por la red micelial en forma de copos blancos, y luego comienza la esporulación del hongo, notándose a las 72 h esporas de color lila claro para Pz-5, mientras que para LBPf-4, es un lila intenso. Gran cantidad de esporas con pocas hifas se observan a los siete días. Estas esporas poseen una capa protectora que los hace más resistentes a los cambios ambientales, lo que no ocurre con las esporas crecidas en los medios líquidos [Fernández-Larrea, 1989].

En los biopreparados estudiados la mayor concentración de conidios se obtuvo a los 10 días con el medio sólido cabecilla de arroz, con diferencias entre el aislado Pz-5 y LBPf-4, para resultar significativamente superior al resto de los medios probados (Tabla 1).

Tabla 1. Características biológicas de los biopreparados sólidos, concentración, viabilidad y su virulencia

Cepas	Sustratos	Cambios morfofisiológicos	Concentración (con/mL)	Viabilidad (%)	Virulencia (%)
Pz-5	Cabecilla de arroz	Hifas a las 48 h de crecimiento Esporulación a las 72 h Gran cantidad de conidios a los ocho días	$9,10 \times 10^8$ a	92	98 a
	Cáscara de arroz	Hifas a las 56 h de crecimiento Esporulación completa a las 96 h Gran cantidad de conidios a los nueve días	$2,05 \times 10^8$ c	85	87 c
	Cabecilla de arroz + cáscara de arroz	Hifas a las 48 h de crecimiento Esporulación completa a las 72 h Gran cantidad de conidios a los siete días	$8,50 \times 10^8$ b	89	95 b
LBPf-4	Cabecilla de arroz	Hifas a las 48 h de crecimiento Esporulación a las 72 h Gran cantidad de conidios a los ocho días	$8,02 \times 10^8$ b	89	95 b
	Cáscara de arroz	Hifas a las 56 h de crecimiento Esporulación completa a las 96 h Gran cantidad de conidios a los nueve días	$1,20 \times 10^8$ d	84	85 c
	Cabecilla de arroz + cáscara de arroz	Hifas a las 48 h de crecimiento Esporulación completa a las 72 h Gran cantidad de conidios a los siete días	$8,20 \times 10^8$ b	89	94 b

El aislado Pz-5 obtuvo un 92% de viabilidad a los 10 días sobre el sustrato sólido cabecilla de arroz, mientras que LBPf-4 resultó ser de un 89%.

Los porcentajes de mortalidad se encuentran dentro de los valores planteados en las Normas Cubanas 72 03/1993, al ser altamente susceptible a la concentración de 10^8 con/mL, donde el aislado Pz-5 obtuvo 98 % de insectos infectados por el hongo, mientras que con LBPf-4 fue de un 95 %, siendo para los dos casos superiores a los planteados por Vidal (1997b) y Herrera (1999) sobre mosca blanca.

Propagación en medios líquido-estáticos, comportamiento del crecimiento, viabilidad y virulencia

Los resultados indican que la combinación de levadura torula al 1% y melaza al 2 % resultó superior y significativamente diferente a los otros medios ensayados. En este medio se alcanzó un título de 10^8 esp/mL a los 10 días de cultivo, con diferencias significativas en los valores de concentración entre LBPz-4 y Pz-5 en todos los medios. Específicamente para el medio número 1 los valores de concentración resultaron ser de $8,5 \times 10^8$ para Pz-5, mientras que para LBP-4 fue de $2,1 \times 10^8$ con/mL (Fig. 2).

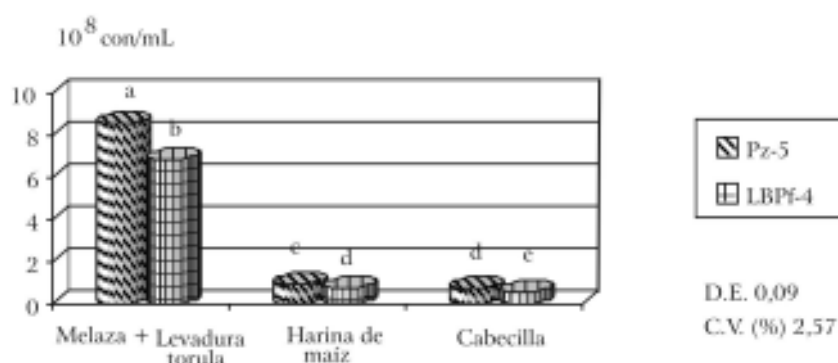


Figura 2. Crecimiento de LBPf-4 y Pz-5 en diferentes medios de cultivos líquidos en condiciones estáticas.

Los resultados corroboran lo expresado por Prescott y Dumm (1967), quienes plantean que la levadura torula y la melaza son ricas en elementos minerales y orgánicos, incluyendo vitaminas. Esto explica que la presencia de estos nutrientes en medio líquido se traduzca en un mejor crecimiento del hongo, los cuales refieren la necesidad de la incorporación en los medios de cultivo de vitaminas y minerales para obtener un buen desarrollo y esporulación de los hongos citado por López (1995).

Estos resultados fueron corroborados con las producciones líquidas, que fueron realizadas en el CREE de San Luis, en la provincia de Pinar del Río, donde reprodujeron *P. fumosoroseus* con melaza + levadura torula, y se obtuvieron títulos de $6,7 \times 10^8$ con/mL [comunicación personal]. En cuanto a los medios de harina de maíz y cabecilla, se alcanzó títulos de 10^7 con/mL, aunque entre ellos existieron diferencias significativas en los valores de concentración. En Cuba tanto la cabecilla de arroz como la harina de maíz son considerados sustratos de bajo costo y de mayor disponibilidad, por lo que no debemos olvidarnos de estos como otra alternativa para la reproducción de *P. fumosoroseus* en medio líquido-estático, en momentos que no se disponga del primer medio, aunque los valores obtenidos de concentración fueron más bajos.

Estudiando el crecimiento de *P. fumosoroseus* en los diferentes medios de cultivo mediante observaciones al mi-

croscopio óptico desde las 48 h hasta los 10 días se pudo constatar que en el medio líquido (melaza + levadura torula) las hifas se presentan gruesas con un tamaño de $3,5 \mu\text{m}$ y abundantes, la esporulación es completa en este medio, mientras que en el 2 y 3 se observan numerosos conidióforos y esporas en proceso de germinación. El hongo presenta la característica de un micelio fino de $2,0-3,5 \mu\text{m}$, mucho más escaso en el medio 3.

La determinación de la concentración de conidios producidos en los medios de cultivos, es una de las formas de evidenciar su potencialidad para provocar patogenicidad en las plagas que ellos controlan, ya que este es uno de sus mecanismos de acción. Los valores del medio (melaza + levadura torula) son superiores a los expresados por Altre en el año 2000.

No obstante la disminución de la producción de esporas, específicamente en algunos de los biopreparados de medio líquido-estático, las que aparecen se encontraban aptas para germinar a los 10 días, lo que se refleja por la viabilidad obtenida en todos los casos, entre un 80 y 89%, mucho más elevada que las obtenidas por Vidal en 1997. Los porcentajes de mortalidad se encuentran dentro de los valores planteados en las Normas Cubanas 72 03/1993, al ser altamente susceptible a la concentración de 10^8 con/mL, donde el aislado Pz-5 obtuvo 93 % de insectos infectados por el hongo, mientras que LBPf-4 fue de un 90 % (Tabla 2).

Tabla 2. Características biológicas de los biopreparados en medio líquido-estático, concentración, viabilidad y virulencia

Cepas	Medios	Cambios morfofisiológicos	Concentración (con/mL)	Viabilidad (%)	Virulencia (%)
Pz-5	Melaza + levadura torula	Micelio grueso a las 48 h Esporulación completa a las 96 h Gran cantidad de conidios a los 10 días	8,52 x 10 ⁸ a	88	93 a
	Harina de maíz	Micelio fino Conidióforo en formación a las 96 h Poco crecimiento a los 10 días	9,27 x 10 ⁷ c	83	80 c
	Cabecilla	Poco micelio muy fino Conidióforo en formación a las 96 h Pocas esporas y poco crecimiento	7,36 x 10 ⁷ d	88	79 c
LBPf-4	Melaza + levadura torula	Micelio grueso a las 56 h Esporulación a las 96 h Cantidad de conidios a los 10 días	6,78 x 10 ⁸ b	85	90 b
	Harina de maíz	Micelio muy fino Conidióforo en formación a las 96 h Muy poco crecimiento a los 10 días	7,26 x 10 ⁷ d	80	79 c
	Cabecilla	Poco micelio muy fino Conidióforo en formación a las 96 h Pocas esporas y poco crecimiento	5,23 x 10 ⁷ e	89	78 c

CONCLUSIONES

- El aislado Pz-5 creció más rápido y proporcionó mejores resultados de concentración que el LBPf-4 sobre el sustrato cabecilla de arroz, al igual que en el medio de cultivo líquido (melaza + levadura torula).
- Sobre la cabecilla de arroz y la combinación de cáscara + cabecilla, la viabilidad de los conidios resulta ser superior a un 89 % para las dos cepas.
- Los porcentajes de mortalidad fueron entre un 95 y 98% tanto para Pz-5 como para LBPf-4 en el soporte de cabecilla de arroz como soporte sólido.
- Resultaron más viables los conidios propagados en el medio líquido combinado (melaza + levadura torula) y en el de cabecilla tanto para Pz-5 como para LBPf-4 por encima de un 85%.
- Los porcentajes de mortalidad se encuentran dentro de los valores planteados en la Norma Cubana 72 03/1993, donde el aislado Pz-5 obtuvo 93% de insectos infectados por el hongo, mientras que LBPf-4 fue de un 90% para el soporte líquido de melaza + levadura torula.

REFERENCIAS

- Altre, J.; J. Vandenberg: «Blastospore Growth and Infectivity by Injection Intofall Armyworm: a Comparison of Two Strain of the Entomopatogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*», Program and abstracts, XXXIII Meeting. University of Guanajuato, México, Aug. 113-18, 2000, p.20.
- Antía-Lodoño, O. P.; F. Posada-Flórez; A. E. Bustillo-Pardey; M. T. González-García: «Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café», *Cenicafé. Avances Técnicos* 182, 1-12, 1992.
- CNSV (Centro Nacional de Sanidad Vegetal): «Programa de defensa fitosanitario para el cultivo de la papa». Ministerio de la Agricultura, La Habana, 2000.
- Fernández-Larrea, O.; M. Fraga: «Influencia de las fuentes de carbohidratos en la reproducción por cultivo sumergido del hongo *Beauveria bassiana*», 1989 (mimeografiado).
- Fonseca, María; J. Machado; J. Vázquez; J. Pérez: «Reproducción y aplicación de *Verticillium lecanii* Zimm (VIEGAS) contra *Coccus viridis* Green en café». Memorias III Encuentro Nacional Científico-Técnico de Bioplaguicidas 11-12 oct., INISAV, 1995, p. 23.
- Herrera, F.; M. Carballo; P. Shannon: «Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *B. tabaci*, en el laboratorio», *Manejo Integrado de Plagas*, Costa Rica, 54, 37-43, 1999.
- López, M. C.: «*Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: caracterización, reproducción y obtención de un biopreparado como efecto nematocida». Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, 1995.
- Norma Cubana: «Método de ensayo. Biopreparado de entomopatógenos. Biotecnología agrícola», 72-02, may., 1993.
- Vidal, C.; J. Fargues; L. A. Lacey: «Intraespecific Variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of Temperature on Vegetative Growth», *Journal Invertebrate pathology*, E.U. 70(1):18-26, 1997a.
- Vidal, C.; L. A. Lacey; J. Fargues: «Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) Against *Bemisia argentifolii* (Homoptera:Aleyrodidae) with a Description of a Bioassay Method», *Journal of Economic Entomology*, E.U., Jun V, 90 (3):765-772, 1997b.
- Vidal, C.; L. S. Osborne; L. Lacey: «Effect of Host Plant on the Potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina:Hyphomycetes) for Controlling the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera:Aleyrodidae) in Greenhouses», *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management* V, 12(3). July, 1998.