



Esporulación de conidias de *Beauveria bassiana* en sustratos de arroz

Sporulation of conidias de *Beauveria bassiana* in rice substrates

Hernán Jorge Poma Laura y Carlos López Blanco

RESUMEN

La reproducción masiva de *Beauveria bassiana* en sustratos sólido, generalmente se da en granos de arroz como matriz, formulación y control de calidad. El objetivo del trabajo fue evaluar la esporulación de conidias de cepas de *B. bassiana* en diferentes sustratos de arroz, realizado en la Estación Experimental Coroico, San Pedro de la Loma, Municipio de Coroico, durante el año 2010. Las variables estudiadas fueron: las características y comportamiento de sustratos de arroz, características y desarrollo de cepas del hongo en sustratos, la conidiación de cepas del hongo en sustratos y los costos de producción. Se utilizó el Diseño Factorial Completamente al Azar con 2 factores: Factor A, sustrato de arroz con sus niveles a_1 , a_2 , a_3 y a_4 (cateto, estaquilla, carolina y arroccillo); Factor B, cepas del hongo con sus niveles b_1 , b_2 , y b_3 (24, 13 y 9205). La maduración del hongo se presentó hasta los 25 días, con esporulación alta en el tratamiento a_1b_3 (cateto x cepa 9205), con $2,03 \times 10^9 \pm 0,33 \times 10^9$ c.g⁻¹, y baja en a_2b_2 (estaquilla x cepa 13), con $5,23 \times 10^8 \pm 1,73 \times 10^8$ c.g⁻¹. Estadísticamente hay dependencia entre las cepas del hongo y los sustratos de arroz, con esporulación heterogénea, con potencial parejo en las cepas, con eficiencia sobre los sustratos cateto y carolina seguida de arroccillo y estaquilla. Los costos unitarios de producción del hongo (200 g. bolsa⁻¹), en arroccillo, cateto, carolina y estaquilla son de 3,92; 4,36; 4,46 y 4,85 Bs. bolsa⁻¹, y 1.254, 1.312, 1.258 y 1.387 Bs. qq⁻¹, logrando 320, 301, 282 y 286 bolsas. qq⁻¹. La relación conidiación vs costos de producción del hongo, rescata al sustrato cateto y carolina, el arroccillo por la cantidad de bolsas obtenidas compensa la esporulación, se descarta el arroz estaquilla por su baja conidiación y alto costo.

PALABRAS CLAVE

Esporulación, conidias, cepas, sustrato, costo de producción, arroz.

ABSTRACT

Massive reproduction of *Beauveria bassiana* in solid substrate generally occurs in rice grains as matrix, formulation and quality control. The objective of this work was to evaluate the sporulation of conidia of *B. bassiana* strains in different rice substrates, carried out at the Coroico Experimental Station, San Pedro de la Loma, Municipality of Coroico, during 2010. The variables studied were: Characteristics and behavior of rice substrates, characteristics and development of fungus strains in substrates, conidiation of fungus strains in substrates and production costs. Factor A, rice substrate with its levels a_1 , a_2 , a_3 and a_4 (heel, staple, carolina and arroccillo) were used. Factor B, strains of the fungus with their levels b_1 , b_2 , and b_3 (24, 13 and 9205). The maturation of the fungus presented up to 25 days, with high sporulation in the treatment a_1b_3 (cathex x strain 9205), with $2,03 \times 10^9 \pm 0,33 \times 10^9$ c.g⁻¹, and low in a_2b_2 (staple x strain 13), With $5,23 \times 10^8 \pm 1,73 \times 10^8$ c.g⁻¹. Statistically there is a dependence between the fungus strains and the rice substrates, with heterogeneous sporulation, with even potential in the strains, with efficiency on the substratum and carolina followed by arroccillo and staquilla. The unit costs of production of the fungus (200 g. bolsa⁻¹), in arroccillo, cateto, carolina and estaquilla are of 3,92; 4,36; 4,46 and 4,85 Bs. bolsa⁻¹, and 1,254, 1,312, 1,258 and 1,387 Bs. qq⁻¹, achieving 320, 301, 282 and 286 bags. qq⁻¹. The relation conidiation vs cost of production of the fungus, rescues the substrate cat and carolina, the arroccillo by the quantity of bags obtained compensates the sporulation, the rice rice is discarded because of its low conidiation and high cost.

KEY WORDS:

Conidia, strains, substrate, cost of production.

AUTORES:

Hernán Jorge Poma Laura: Facultad de Agronomía -UMSA.

Carlos López Blanco: Docente Facultad de Agronomía – UMSA. Cel. 591-7353-2720. calobla9@yahoo.es

Recibido: 31/03/17. **Aprobado:** 28/05/17.

INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos pueden ser utilizados, para el control de insectos plaga, en diferentes estrategias, como insecticida microbial, siendo necesario producir masivamente, formularlo y liberarlo oportunamente en el campo para disminuir la población de insectos plaga. El sustrato de granos libres o quebrados es el más estudiado, donde el arroz es de mayor uso, ya que conserva las condiciones de viabilidad, patogenicidad y producción de volúmenes

mayores de esporas (conidias), considerados como altos rendimientos de material infectivo. El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es el hongo más estudiado por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica.

A nivel de los Yungas paceño se cuenta con cepas promisorias del hongo *B. bassiana* (nativas y exótica), específicas en el control de *Hypothenemus hampei*, con antecedentes de selección, bioensayo y aplicación. Las cepas del hongo se producen en

sustrato de arroz desconociendo la cuantificación de conidias bajo un método estándar. Por consiguiente, el objetivo del trabajo fue estudiar la producción masiva de cepas del hongo bajo diferentes sustratos de arroz, determinando la concentración de unidades infectivas (conidias) en peso y/o volumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Estación Experimental Coroico, comunidad de San Pedro de la Loma Municipio de Coroico, Provincia Nor Yungas del departamento de La Paz. Geográficamente ubicado a 16° 12' 17" de Latitud Sur y 67° 41' 52" de Longitud Oeste, a una altura promedio de 1.630 m.s.n.m., la precipitación pluvial promedio de 1.621 mm.año⁻¹; la temperatura anual de 21,5 °C, y la humedad relativa de 80,79%. El método de trabajo se basó en las siguientes fases de estudio:

Reconocimiento, acondicionamiento y condiciones de laboratorio

El trabajo se inició con el reconocimiento de laboratorio de entomopatógenos en la Estación Experimental Coroico, acondicionando las áreas de preparación de sustratos, inoculación, incubación y maduración. A su vez, con la recomendación de CENICAFE (1996) y Pérez (2002), el laboratorio en el proceso de maduración del hongo, se mantuvo a un promedio de 24 °C, bajo condiciones asépticas.

Antecedentes de la calidad de cepas del hongo B. bassiana

Se identificó las cepas nativas provenientes de los Yungas (24 PV/CC, 13 U/VB) y la cepa exótica 9205 proveniente de Colombia (CENICAFE), detallándose los antecedentes de calidad en el Cuadro 1.

Tabla 1. Antecedentes de calidad de las cepas del hongo B. bassiana.

Cepa	Origen	Concentración		Viabilidad (%)	Pureza (%)	Patogenicidad (%)
		c.ml ⁻¹	c.g ⁻¹			
24						
PV/CC	Yungas	3,50*10 ⁷	1,40*10 ⁹	-	-	98
13 U/VB	Yungas	3,50*10 ⁷	1,40*10 ⁹	-	-	97
B.b. 9205	Colombia	3,87*10 ¹¹	7,74*10 ⁹	85 - 100	99,80	97

Fuente: Bustillo et al. (1998) y Cordero (1999).

Reproducción masiva del hongo a partir de cepas purificadas

- Selección de impurezas, lavado e hidratado del arroz

Se trabajó con arroz cateto, estaquilla, carolina y arrocillo (Figura 1), separando elementos indeseables

como cascarillas, piedrecillas, semillas de malezas, granos picados. El arroz seleccionado se lavo con agua, quitándole el polvillo, luego se hidrato en agua hervida por 0,67 h, con el fin de ganar humedad mediante la absorción de los granos, finalmente se escurrió el exceso de agua en un colador por gravedad.

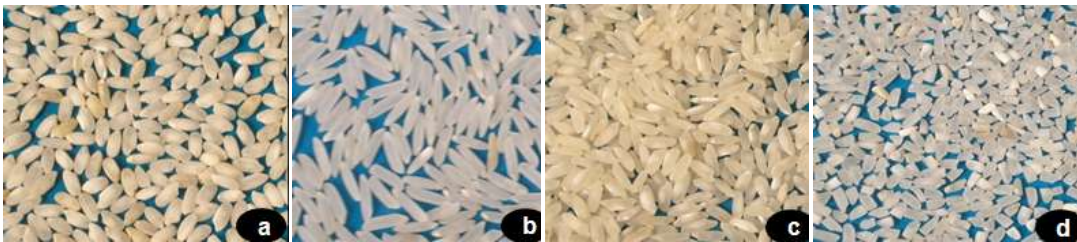


Figura 1. Sustratos de arroz utilizados: a) Cateto; b) Estaquilla; c) Carolina; d) Arrocillo. Fuente: Fotografías EEC (2010).

- Embolsado y esterilización de sustratos de arroz

Para la contención y desarrollo del hongo se empleó bolsas de polipropileno, empleando 100 g.bolsa⁻¹, cerrando y asegurando con grapas, llevándose a la olla a presión. La esterilización de bolsas con sustrato tomo un tiempo de 0,5 h, a una temperatura y presión aproximada de 121 °C y 1,5 atmósferas. Las bolsas esterilizadas se trasladaron a la Cámara de Flujo Laminar, donde se enfriaron y sometieron a rayos ultra violeta (acción germicida) por un tiempo de 6 h, para su posterior inoculación.

- Inoculación y maduración de *B. bassiana*

La reproducción masiva de *B. bassiana* (tratamientos: cepas + sustratos), a partir de matrices purificadas, se realizó con la inoculación del hongo en los sustratos con la ayuda del Asa de Platino cerca de un mechero Bunsen, registrando la fecha, código y cepa. Las bolsas inoculadas se agitaron para diseminar las conidias y acelerar el contacto y germinación respectiva, disponiéndose en la cámara de incubación de forma ordenada por tratamientos para su maduración. Se efectuó un seguimiento por ± 25 días, evidenciando la maduración completa de cepas del hongo con una esporulación abundante de conidias.

Lectura de concentración de conidias

El conteo de conidias de cepas del hongo, se realizó posterior a los 25 días. Se utilizó la metodología propuesta por Antia *et al.* (1992), procediendo a preparar la solución madre o dilución 10⁰ con un

volumen de Agua Destilada Estéril (ADE) de 200 ml, el hongo producido (100 g) y aceite agrícola Carrier al 0,1%; a su vez se preparó tubos de ensayo con 9 ml de ADE en orden secuencial en gradilla. De la solución madre, previa agitación se tomó la submuestra de 1 ml depositando al primer tubo de ensayo, obteniendo así la dilución 1 o 10¹, llevando de esta, 1 ml al siguiente tubo, obteniendo la dilución 2 o 10² y así, hasta lograr la dilución apropiada (10⁴), que permitió el conteo (c.ml⁻¹) de la suspensión. La dilución adecuada permitió facilitar conteos de 10 a 50 conidias por cuadrante.

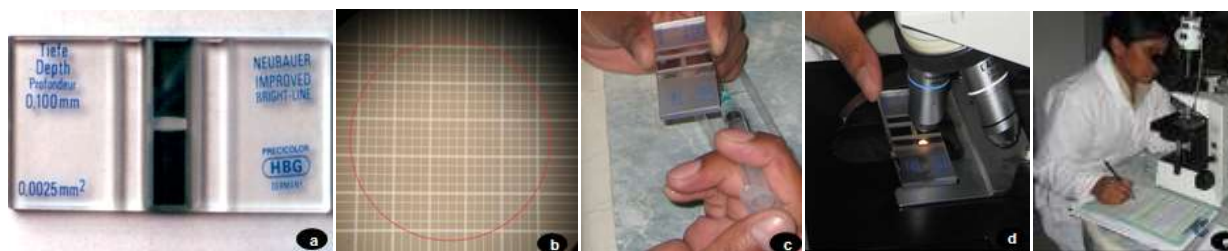
Para el conteo se utilizó un microscopio y la Cámara de Neubauer (Figura 2a), esta última dividida en 2 retículos, cada una subdividida en 9 cuadros de 1 mm² con un área total de 9 mm². Para el caso se utilizó el cuadrante central subdividido en 25 cuadrantes y estos a su vez en 16 cuadros más pequeños (Figura 2b), cuyo factor es 10⁴. La dilución adecuada (10⁴) se agito durante 30 segundos y se tomó una muestra aproximada de 0,01 ml, depositando en cada retículo de la cámara (Figura 2c), con la ayuda del microscopio (objetivo 10X) se localizó el campo central de conteo de tal forma que se observe nítidamente los cuadrantes y luego se pasó al objetivo 40X precediéndose con el conteo respectivo (Figura 2d, 2e). La concentración de conidias se calculó empleando la formula siguiente:

$$C = N * \text{Dilución empleada} * \text{Factor cámara}$$

Dónde:

C: Concentración que se desea conocer

N: Número promedio de esporas por cuadrante.



- a) Cámara de Neubauer o Hemocitómetro, dividida em dos retículos de conteo.
- b) Reticulo central de conteo de La Cámara de Neubauer.
- c) Depósito de muestra de la dilución 10⁴) en la Cámara de Neubauer.
- d) Localización de los campos de conteo con microscopio (10X, 40X).
- e) Registro de conteo de conidias del hongo en microscópio.

Figura 2. Proceso de conteo de conidias de cepas del hongo *B. bassiana* (Tratamientos: cepas x sustratos).
Fuente: Fotografías EEC (2010).

Según CENICAFE (1996) y López (2003), el conteo se establece sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara, realizando tres veces este procedimiento con seis lecturas.

Variables de estudio

- Evaluar las características y comportamiento de los granos de arroz en el proceso de preparación, conociendo el porcentaje de granos enteros y partidos, y determinando la ganancia de peso en humedad o agua después de la hidratación y esterilización respectivamente.
- Evaluar las características físicas del hongo *B. bassiana*, y las etapas de desarrollo en su fase saprofítica en sustratos de arroz.
- Determinar la concentración de unidades infectivas (conidias) de las cepas de *B. bassiana* en los diferentes sustratos de arroz, en unidades de peso y/o volumen.
- Determinar los costos de producción del hongo, bajo la tecnología artesanal de laboratorio comunal.

Diseño experimental

El presente estudio se llevó bajo el diseño “Factorial Completamente al Azar” con factorial 4 x 3 (Factor A x B), haciendo 12 tratamientos en 4 repeticiones, con 48 unidades experimentales (3 bolsas por unidad experimental), con un margen de error del 5%. Se realizó las pruebas: Análisis de Varianza, Análisis de efectos simples en factores y niveles (Análisis de Interacción), Varianzas, Desviación Estándar y

prueba de rango múltiple (Little y Hills, 1990; Calzada, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características y comportamiento de sustratos de arroz

Los sustratos de arroz empleados en la producción de *B. bassiana*, presentaron características propias referente a la calidad de sus granos (Cuadro 2), determinando la relación de granos enteros y partidos en muestras de 10 g. Para el caso los resultados indican que el sustrato estaquilla tuvo mayor número de granos enteros y por ende menor número de granos partidos, seguido de carolina y cateto respectivamente, y por el contrario el arroccillo presento casi en su totalidad granos partidos en 99,40%.

A partir de un peso seco inicial de sustratos de arroz (3200 g), realizada la hidratación y esterilización, estas manifestaron la ganancia en peso por la absorción de agua, de forma heterogénea, influyendo la hidroscopticidad y la dureza de los granos, siendo superior en arroccillo con 39,29%, seguido de cateto, estaquilla y carolina con 30,79%; 24,32% y 22,37%, traducido en peso de agua absorbido de 1257,28; 985,28; 778,24 y 715,84 g respectivamente (Cuadro 3). La pérdida de humedad en el proceso de esterilizado de sustratos hidratados fue mínima con 0,05%, traducido en peso de agua de 20,64 g del peso total, indicando que las bolsas de polipropileno empleadas, son resistentes a altas temperaturas e impermeables, manteniendo la humedad interna para el desarrollo y preservación del hongo.

Tabla 2. Características de los sustratos de arroz.

Sustrato de arroz	Peso (g)	Número de granos		Peso (g)		Porcentaje (%)	
		GE	GP	GE	GP	GE	GP
Cateto	10	316±11	114±18	8,38	1,62	83,80	16,20
Estaquilla	10	343±10	58±14	9,04	0,96	90,40	9,60
Carolina	10	335±6	72±13	8,89	1,10	88,90	11,10
Arroccillo	10	6±3	1100±33	0,06	9,94	0,60	99,40

Referencias: GE: Granos enteros; GP: Granos partidos.
Fuente: Propia (2010).

Tabla 3. Ganancia en peso de agua en sustratos de arroz.

Sustrato de arroz	Peso seco (g)	%	Peso Hidratado (g)	%	Peso esterilizado (g)	%
Cateto	3200	100	4206,08	131,44	4185,28	130,79
Estaquilla	3200	100	3995,84	124,87	3978,24	124,32
Carolina	3200	100	3937,92	123,06	3915,84	122,37
Arrocillo	3200	100	4479,36	139,98	4457,28	139,29
Promedio	3200	100	4154,80	129,83	4134,16	129,19

Fuente: Propia (2010).

Gutiérrez *et al.* (1995); citado por la Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (1997), señalan que el empleo de sustrato de arroz en cultivo de hongos tiene la capacidad de retener agua interviniendo en la constitución de los microorganismos y en la difusión de enzimas, nutrientes y productos a través de la materia sólida. El agua libre debe permitir el desarrollo de entomopatógenos (humedad mayor al 50%) sin reducir la porosidad del material ni disminuir el intercambio de gases.

Características y comportamiento del hongo en proceso de desarrollo en sustratos

El desarrollo de cepas de *B. bassiana*, sobre los sustratos de arroz, se manifestó hasta los 25 días, desde la inoculación hasta la liberación de conidias. El desarrollo del hongo sobre los sustratos se dio de forma inundativa, con cubrimiento de los mismos. Las cepas del hongo presentaron sus características propias en estructura, color y consistencia (Figura 3).



Figura 3. Desarrollo de *B. bassiana* en sustratos de arroz de las cepas: a) 24, b) 13 y c) 9205. Fuente: Fotografías EEC (2010).

Las cepas de *B. bassiana* (24, 13 y 9205), se caracterizaron en su fase inicial por una consistencia algodonosa, llegando a su fase final con una estructura compacta conidiogénica pulverulenta. Las cepas del hongo tienen diferencias en su coloración natural, siendo en la cepa 24 cremosa a amarillo, en la 13 crema suave, y en la 9205 blanca intensa. No se tuvo cambios de coloración (amarilla o violeta) que suele ocurrir como mecanismo de defensa a contaminantes (bacterias).

La fase saprofítica del hongo en medio natural, presentó las siguientes etapas: 1) Germinación de conidias; 2) Inicio de micelio de aspecto algodonoso abundante no muy compacto con sus coloraciones respectivas; 3) Cubrimiento de micelio, forma abundante y compacta; 4) Conidiogénesis, con

formación de conidióforos y conidias; 5) Liberación de conidias, de aspecto pulverulento.

Narváez *et al.* (1997), señalan que la producción de conidias del hongo depende del medio de cultivo, es decir responden mejor a un sustrato que a otro, debido a los nutrientes que lo conforman. Asimismo, Castañares (1993), manifiesta que las características morfológicas y de pigmentación indica la diversidad metabólica en hongos del genero *Beauveria* de acuerdo a la procedencia de las mismas, evidenciando estas diferencias marcadas en las tres cepas estudiadas.

Determinación de la concentración de unidades infectivas del hongo

La concentración de conidias de *B. bassiana*, en sustratos de arroz, obtenido en volumen (c.ml⁻¹) y unidad de peso (c.g⁻¹), a los 25 días de maduración, manifestó una esporulación definitiva de las cepas del

hongo (Figura 4a y 4b). La dilución obtenida (10⁴), en la formulación (hongo + ADE), da a entender que las cepas del hongo tienen alta esporulación en un tiempo mayor de maduración.



a) Conidiación de La cepa exótica 9205 en sustrato de arroz.
b) Conidiación de la cepa nativa 13 en sustrato de arroz.
c) Conidias en el retículo de conteo en la Cámara de Neubauer.

Figura 4. Conidiación de cepas de *B. bassiana* en sustratos de arroz y conteo de conidias.
Fuente: Fotografías EEC (2010).

Las lecturas realizadas en la Cámara de Neubauer (Figura 4c), determino la tasa de concentración de conidias de cepas de *B. bassiana* (Cuadros 4). La esporulación más baja se manifestó en el tratamiento a₂b₂ (Estaquilla x cepa 13), en peso de 97,40±0,36 g, se obtuvo 2,54*10⁸±0,85*10⁸ c.ml⁻¹ equivalente a

5,23*10⁸±1,73*10⁸ c.g⁻¹, la más alta ocurrió en el tratamiento a₁b₃ (cateto x cepa 9205) en peso de 100,52±3,29 g, con 2,81*10⁹±0,34*10⁹ c.ml⁻¹, equivalente a 2,03*10⁹±0,33*10⁹ c.g⁻¹ respectivamente.

Tabla 4. Concentración de conidias de cepas del hongo a los 25 días de maduración.

A x B	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄
	Cateto	Estaquilla	Carolina	Arrocillo
b ₁ Cepa 24	*97,50±7,05	101,06±1,49	100,95±5,88	92,77±6,64
	**3,38*10 ⁸ ±0,35*10 ⁸	3,30*10 ⁸ ±1,28*10 ⁸	7,48*10 ⁸ ±1,61*10 ⁸	3,24*10 ⁸ ±1,28*10 ⁸
	***6.98*10 ⁸ ±0,96*10 ⁸	6,48*10 ⁸ ±2,56*10 ⁸	1,47*10 ⁹ ±0,23*10 ⁹	7,02*10 ⁸ ±2,87*10 ⁸
b ₂ Cepa 13	97,03±1,97	97,40±0,36	97,91±5,74	89,37±2,73
	7,22*10 ⁸ ±0,45*10 ⁸	2,54*10 ⁸ ±0,85*10 ⁸	6,67*10 ⁸ ±4,62*10 ⁸	4,36*10 ⁸ ±0,42*10 ⁸
	1,48*10 ⁹ ±0,61*10 ⁹	5,23*10 ⁸ ±1,73*10 ⁸	1,36*10 ⁹ ±0,93*10 ⁹	9,80*10 ⁸ ±1,25*10 ⁸
b ₃ Cepa 9205	100,52±3,29	95,21±4,27	101,80±6,41	90,46±1,89
	2,81*10 ⁹ ±0,34*10 ⁹	2,94*10 ⁸ ±0,38*10 ⁸	4,39*10 ⁸ ±3,48*10 ⁸	4,24*10 ⁸ ±0,41*10 ⁸
	2,03*10 ⁹ ±0,33*10 ⁹	6,21*10 ⁸ ±0,99*10 ⁸	8,36*10 ⁸ ±2,70*10 ⁸	9,39*10 ⁸ ±0,93*10 ⁸

Referencias: *Peso cantidad del hongo en bolsa (formulación): g.

**Por unidad de volumen: c.ml⁻¹.

***Por unidad de peso: c.g⁻¹.

Fuente: Propia (2010).

Los resultados indican heterogeneidad en la concentración de conidias, presentando alta esporulación los tratamientos a₁b₃ (cateto x cepa 9205), a₁b₂ (cateto x cepa 13), a₃b₁ (carolina x cepa 24) y a₃b₂ (carolina x cepa 13); esporulación media en el sustrato arrozcillo con las tres cepas, a₃b₃ (carolina x cepa 9205) y a₁b₁ (cateto x cepa 24); y esporulación baja en el sustrato estaquilla con las 3 cepas,

suponiendo que influyo la dureza del grano (baja hidratación) y el poco polvillo que presento (arroz limpio pulido).

CENICAFE (1995), indica que la cepa 9205 en Colombia, desarrollada a una temperatura de 27±2 °C en botellas con 50 g de arroz a 20 días de incubación, manifestó una esporulación de 3,87*10¹¹±0,44*10¹¹

c.ml⁻¹ equivalente a $7,74 \cdot 10^9$ c.g⁻¹, siendo 74 veces más alta que la obtenida en el tratamiento a₁b₃, (cepa 9205 x sustrato cateto), producida en bolsa de polipropileno a una temperatura de 24 °C. Esto confirma la influencia que ejerce la temperatura, la metodología de producción, los sustratos de arroz empleados, acelerando o retardando la maduración y la esporulación de conidias del hongo, obteniéndose en nuestro caso hasta los 25 días con relación a los 20 días de CENICAFE-Colombia.

- Análisis de varianza de concentración de conidias

El Análisis de Varianza (ANVA) (Cuadro 5), demuestra que el factor A (sustratos) es significativo respecto al factor B (cepas del hongo), a su vez estos factores interactúan (A x B) o sea son dependientes, no correspondiendo el análisis por separado. La interacción señala las diferencias de conidiación de cepas del hongo (24, 13 y 9205) sobre los diferentes sustratos de arroz (cateto, estaquilla, carolina y arrocillo).

Tabla 5. ANVA de la esporulación de cepas del hongo.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)
A	3	$4,66 \cdot 10^{18}$	$1,55 \cdot 10^{18}$	11,53	2,87 *
B	2	$5,07 \cdot 10^{17}$	$2,53 \cdot 10^{17}$	1,88	3,23 NS
A x B	6	$4,23 \cdot 10^{18}$	$7,05 \cdot 10^{17}$	5,24	2,37 *
Error	36	$4,85 \cdot 10^{18}$	$1,35 \cdot 10^{17}$		
Total	47				

Coefficiente de Variación: 35.82%.

Fuente: Propia (2010).

- Análisis de efectos simples de la interacción (A x B)

La interacción A x B, se analizó independientemente a partir de un factor en los niveles del otro factor mediante análisis de varianzas, en base a una tabla de

doble entrada de promedios de esporulación de conidias (Cuadro 6), de los diferentes tratamientos, graficándose para ambos factores el comportamiento de esporulación de conidias para su interpretación, sustentando al final con la prueba de rango múltiple Duncan, bajo una probabilidad de error de 0,05%.

Tabla 6. Combinación de factores con promedios de conidiación (c.g⁻¹).

A x B	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	Promedio
b ₁	$6,98 \cdot 10^8$	$6,48 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^9$	$7,02 \cdot 10^8$	$8,79 \cdot 10^8$
b ₂	$1,48 \cdot 10^9$	$5,23 \cdot 10^8$	$1,36 \cdot 10^9$	$9,80 \cdot 10^8$	$1,09 \cdot 10^9$
b ₃	$2,03 \cdot 10^9$	$6,21 \cdot 10^8$	$8,36 \cdot 10^8$	$9,39 \cdot 10^8$	$1,11 \cdot 10^9$
Promedio	$1,40 \cdot 10^9$	$5,98 \cdot 10^8$	$1,22 \cdot 10^9$	$8,74 \cdot 10^8$	$1,02 \cdot 10^9$

Fuente: Propia (2010).

- Análisis de Varianza de efectos simples de los factores A x B

El ANVA del Factor B en los niveles del Factor A (Cuadro 7), muestra diferencias estadísticas

significativas para los niveles a₁ y a₂ (sustrato cateto y estaquilla), influyendo en la esporulación heterogénea de conidias. En cambio en los niveles a₃ y a₄ (sustrato carolina y arrocillo) es no significativo, manifestando igualdad estadística, con poca variación de conidiación en dichos niveles.

Tabla 7. ANVA de efectos simples del factor B en los niveles de A.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (0,05)
B(a ₁)	2	3,46*10 ¹⁸	1,73*10 ¹⁸	12,91	3,27*
B(a ₂)	2	3,46*10 ¹⁸	1,73*10 ¹⁸	12,91	3,27*
B(a ₃)	2	7,96*10 ¹⁷	3,98*10 ¹⁷	2,97	3,27 NS
B(a ₄)	2	1,63*10 ¹⁷	8,15*10 ¹⁶	0,61	3,27 NS
Error	36	4,85*10 ¹⁸	1,35*10 ¹⁷		

Fuente: Propia (2010).

Tabla 8. Comparación de conidiación de cepas del hongo sobre sustratos.

Tipos de arroz	a ₁ Cateto	a ₃ Carolina	a ₄ Arrocillo	a ₂ Estaquilla
Promedios	1,40*10 ⁹	1,22*10 ⁹	8,47*10 ⁸	5,98*10 ⁸

Duncan P ≤ 0.05.

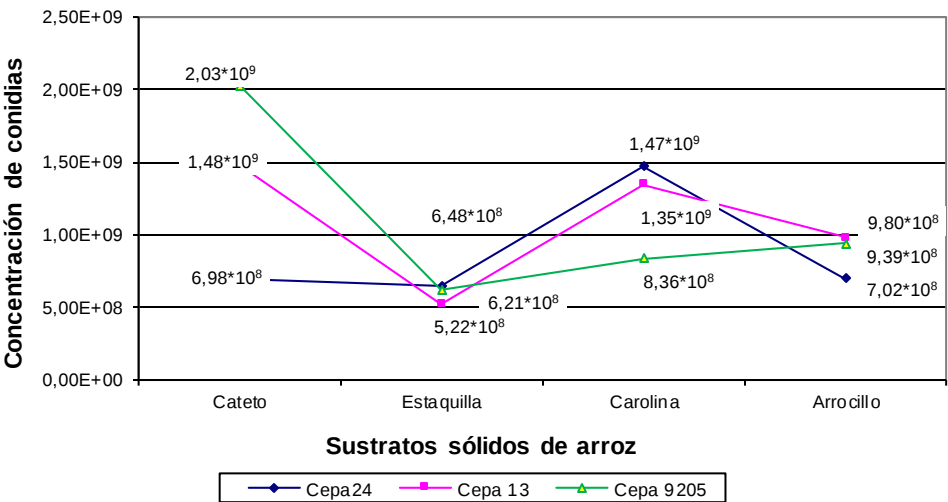


Figura 5. Esporulación de conidias de cepas del hongo sobre sustratos de arroz.
Fuente: Propia (2010).

Con el análisis de efectos simples del Factor B en niveles del Factor A, en base al ANVA de efectos simples, la gráfica (Figura 5) y la prueba Duncan (Cuadro 8), se tiene la siguiente interpretación:

- La esporulación de conidias del hongo en las cepas 13 y 9205, sobre los sustratos cateto y estaquilla es heterogéneo (significativo), superior en el primero respecto al segundo. La conidiación homogénea (no significativa) de cepas del hongo en los sustratos carolina y arroccillo, con mínima

superioridad de las cepas 24 y 13 en el sustrato carolina.

- Analizando el comportamiento del hongo, la cepa 9205 tiene mayor esporulación sobre el arroz cateto respecto a los demás tratamientos, presentando mínima esporulación en estaquilla con las tres cepas, con menor esporulación en carolina y similar e intermedia en arroccillo con relación a las otras cepas.
- La esporulación de la cepa 13 en arroz cateto muestra superioridad mínima en relación a

carolina, presentando una esporulación media en arrozillo e inferior en estaquilla. Es la cepa mejor adaptada a los sustratos cateto, carolina y arrozillo, y similar a las otras cepas en estaquilla con esporulación baja.

- La cepa nativa 24 tiene una esporulación elevada en el sustrato carolina, y con similitud con poca variación en los sustratos cateto, estaquilla y arrozillo respectivamente.
- La prueba Duncan, indica estadísticamente la esporulación de conidias de cepas del hongo sobre

sustratos de arroz, siendo los mejores cateto y carolina seguido de arrozillo y estaquilla.

El Análisis de Varianza de efectos simples del Factor A en los niveles del Factor B (Cuadro 9), demuestra estadísticamente diferencias significativas para los niveles b_1 , b_2 y b_3 respectivamente lo cual indica heterogeneidad de las cepas del hongo en esporulación de conidias sobre los sustratos de arroz.

Tabla 9. ANVA de efectos simples del factor A en niveles de B.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (0,05)
A(b_1)	3	$1.82 \cdot 10^{18}$	$6.07 \cdot 10^{17}$	4.49	2.87 *
A(b_2)	3	$2.17 \cdot 10^{18}$	$7.23 \cdot 10^{17}$	5.36	2.87 *
A(b_3)	3	$4.81 \cdot 10^{18}$	$1.60 \cdot 10^{18}$	11.85	2.87 *
Error	36	$4.85 \cdot 10^{18}$	$1.35 \cdot 10^{17}$		

Fuente: Propia (2010).

Tabla 10. Comparación de conidiación de cepas de *B. bassiana*.

Cepas de <i>B. bassiana</i>	b_3	b_2	b_1
	Cepa 9205	Cepa 13	Cepa 24
Promedios	$1,11 \cdot 10^9$	$1,08 \cdot 10^9$	$8,79 \cdot 10^8$

Duncan $P \leq 0.05$.

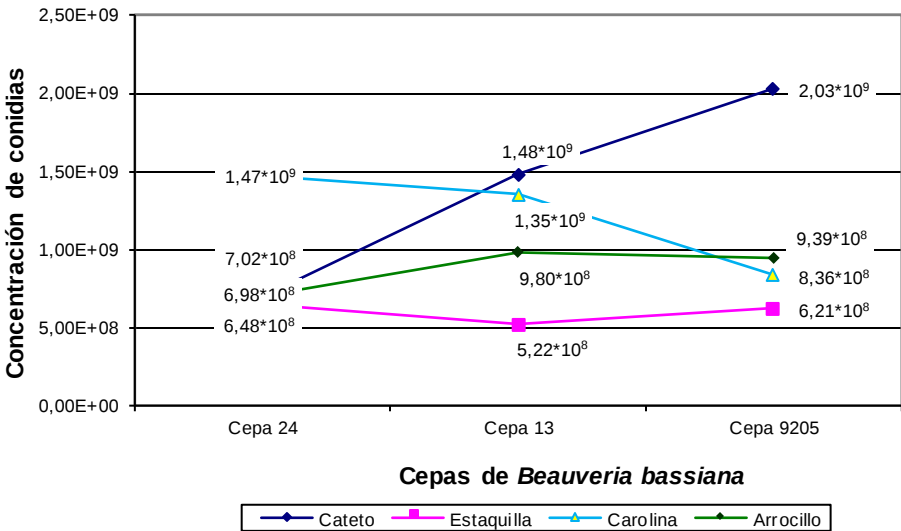


Figura 6. Influencia de sustratos de arroz en conidiación de cepas de *B. bassiana*. Fuente: Propia (2010).

El análisis de efectos simples del Factor A en los niveles del Factor B, en base al ANVA, la gráfica (Figura 6) y la prueba Duncan, se llega a la siguiente interpretación:

- El comportamiento de los sustratos de arroz respecto a la esporulación de cepas del hongo, es significativo, con heterogeneidad en desarrollo y formación de conidias.
- La gráfica, indica mayor conidiación en sustrato cateto con la cepa 9205, de la misma forma con la cepa 13 (igual a carolina, cepa 24 y 13), y baja con la cepa 24 (igual a estaquilla y arrozillo).
- El sustrato carolina, tiene una conidiación favorable con las cepas 24 y 13, casi similares con el sustrato cateto y cepa 13, siendo inferior con la cepa 9205 (similar a arrozillo y estaquilla).
- El sustrato arrozillo, tiene una homogeneidad de conidiación con la cepa 13 y 9205, con una leve inferioridad con la cepa 24. Es el sustrato con mayor uniformidad con relación a los demás sustratos.
- El sustrato estaquilla presenta una homogeneidad de esporulación con las tres cepas, siendo la más baja con relación a los otros sustratos.
- La prueba Duncan, manifiesta que las cepas estadísticamente son similares, respecto al potencial de esporulación de conidias sobre sustratos de arroz, con variación poco significativa.

Relacionando los análisis expuestos se llega a uno global, siguiente:

- Existe dependencia entre los factores sustratos de arroz y cepas de *B. bassiana*, con esporulación heterogénea de unidades infectivas (conidias).
- Las gráficas muestran la conidiación en unidad de peso (c.g^{-1}), manifestando superioridad las cepas 9205 y 13 en sustrato cateto, la cepa 24 en sustrato carolina, manifestando superioridad el primero en 27 veces respecto al segundo y tercero y 34 veces con respecto al cuarto.
- Los valores regulares de conidiación se presentan en la cepa 24 y 9205 en cateto y carolina, siendo inferior en 65 y 41 veces respecto al mejor tratamiento. Asimismo, las cepas 13, 9205 y 24

en arrozillo, manifiestan inferioridad en 52, 54 y 65 veces con relación a la mejor esporulación.

- Los valores mínimos de esporulación con las cepas 24, 9205 y 13, se presentaron en el sustrato estaquilla, manifestando una inferioridad respecto al mejor valor de esporulación (cepa 9205 en sustrato cateto) de 68, 69 y 74 veces respectivamente.
- El análisis de comparación estadística respecto a la esporulación de conidias, en sustratos resultaron ser los mejores, los sustratos: cateto y carolina, seguido de arrozillo; en lo referente a las cepas del hongo *B. bassiana*, resultaron ser similares con un alto potencial esporulativo de conidias.

Humphreys y coautores (1989); citado por SAGDR (1997), señalando que las conidias aéreas de hongos se obtienen masivamente en cultivos de sustrato sólido, granos precosidos, con dificultad de obtener productos de calidad homogénea. Asimismo, Alves (1986), indica que los entomopatógenos presentan una variabilidad genética recurrente de heterocariosis que resulta con diferentes grados de patogenicidad, virulencia, especificidad, producción de conidias y resistencia a factores abióticos.

Costos parciales de producción a nivel de laboratorio comunal

Los estimativos se hicieron basados en precios de la gestión del 2010. Para el cálculo de mano de obra se estimó una producción de 100 bolsas del hongo (200 g.bolsa^{-1}) por jornal, también se calculó la energía requerida (gas licuado), descartando los costos de energía eléctrica y agua, el primero por la ausencia del servicio en comunidades y el segundo por usos y costumbres (Derechos y Ley de aguas).

El Cuadro 11 muestra los costos de producción por bolsa de *B. bassiana* en base a los insumos necesarios que se emplean en la producción directa (Costos variables), descartando los equipos, materiales y ambiente (Costos fijos). Así mismo el Cuadro 12 muestra los costos de producción del hongo a partir de la relación peso estándar de sustrato por número de bolsas obtenidas.

Tabla 11. Costos de producción del hongo en sustratos.

Sustrato de arroz	Costo Unitario (Bs/bolsa de 200 g)
Cateto	4,36
Estaquilla	4,85
Carolina	4,46
Arrocillo	3,92

Fuente: Propia (2010).

Tabla 12. Costo de producción del hongo en relación sustratos/bolsas obtenidas.

Sustrato	Costo de compra (Bs/qq)	Costo Unitario (Bs/bolsa de 200 g)	Obtención de bolsas (200 g/qq)	Costo de producción (Bs/qq)
Cateto	220	4,36	301	1312,36
Estaquilla	340	4,85	286	1387,10
Carolina	230	4,46	282	1257,72
Arrocillo	95	3,92	320	1254,40

Fuente: Propia (2010).

Existe variabilidad de costos por unidad de bolsa del hongo, siendo más económico en arrozillo con 3,92 Bs.bolsa⁻¹ y con mayor costo en estaquilla con 4,85 Bs.bolsa⁻¹. Los costos en relación al peso estándar de sustrato (1 qq), por el número de bolsas obtenidas, hay similitud en carolina y arrozillo con diferencia mínima (1257,72 y 1254,40 Bs), con mayor costo en estaquilla. Respecto al número de bolsas obtenidas el arrozillo (320 bolsas) tiene ventaja respecto a carolina, estaquilla y cateto con 38, 34 y 19 bolsas.

Relacionando los costos de producción con la esporulación del hongo, rescatar a las cepas 9205 y 13 en el arroz cateto, las cepas 24 y 13 en carolina, y las tres cepas en arrozillo, descartando al sustrato estaquilla por el costo alto y la baja esporulación. De manera general los sustratos cateto y carolina son los mejores en la producción de *B. bassiana*, debiéndose mejorar la hidratación (> a 45 minutos) para una mayor absorción de agua y eficiencia en esporulación. Asimismo, el sustrato arrozillo por su alta hidratación (obtención de más bolsas), esporulación aceptable y su bajo costo, compensa la esporulación de conidias del hongo.

Feng *et al.* (1994); citado por la SAGDR (1997), señalan tres requerimientos para la producción exitosa de entomopatógenos: 1) hongos con alta patogenicidad y virulencia, 2) formulación sin

pérdida de viabilidad e infectiva, 3) costos de producción mínimos, en medios simples, barato, disponible en cantidades suficientes y un procedimiento de producción fácil, con un mínimo de labor. Asimismo, Fernández (2007), señala que los métodos de producción tienen ventajas y desventajas, por lo que la decisión depende de varios factores, entre los cuales, la calidad del producto final, la factibilidad tecnológica y económica son los más importantes.

CONCLUSIONES

Los sustratos de arroz empleados en la producción de *B. bassiana*, presentaron características propias de sus granos (enteros y partidos), presentando mejor calidad el arroz estaquilla, seguido de carolina, cateto y arrozillo, con granos enteros en 90,40%; 88,90%; 83,60% y 0,60%; granos partidos en 9,60%; 11,10%; 16,20% y 99,40% respectivamente.

En el proceso de preparación de sustratos, después de la hidratación y esterilización, presentaron heterogeneidad en la absorción de agua, con ganancia en peso superior en el sustrato arrozillo con 39,29%, respecto a cateto, estaquilla y carolina con 30,79%; 24,32% y 22,37% respectivamente.

La concentración de conidias de cepas del hongo en sustratos de arroz, hasta los 25 días, manifestó mayor esporulación el tratamiento a_1b_3 (cateto x cepa 9205), con $2,03 \cdot 10^9 \pm 0,33 \cdot 10^9$ c.g⁻¹, y la mínima en el tratamiento a_2b_2 (estaquilla x cepa 13), con $5,23 \cdot 10^8 \pm 1,73 \cdot 10^8$ c.g⁻¹.

Estadísticamente existe dependencia entre los factores sustrato de arroz y *B. bassiana*, con esporulación heterogénea. El análisis de comparación determino que los mejores sustratos son cateto y carolina seguido de arrozillo; y las cepas del hongo son similares con un alto potencial esporulativo.

Los costos unitarios de producción del hongo por unidad de bolsa (200 g), fue variable, con costos de 3,92; 4,36; 4,46 y 4,85 Bs. bolsa⁻¹ en arrozillo, cateto, carolina y estaquilla, y los costos de 1254,40; 1312,36; 1257,72; y 1387,10 Bs. qq⁻¹, con la obtención de 320, 301, 282 y 286 bolsas respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alves, S. B. (1986). *Controle microbiano de insectos fungos entomopatogenicos*. Sao Paulo, Brasil. Editora Manole. p. 73 – 75

Antia, O. P.; Posada, F. J.; Bustillo, A. E.; Gonzales, M. T. (1992). *Producción en finca del hongo Beauveria bassiana para el control de la broca del café*. CENICAFE. N° 182: 1 – 12.

Bustillo, P., A. E.; Cárdenas M., R.; Villalba G., D.A.; Benavidez M., P.; Orozco H., J.; Posada F., F. J. (1998). *Manejo integrado de la broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari) en Colombia*. Chinchiná, CENICAFE. P. 134.

Calzada, J. (1982). *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima (Perú). Ed. Universidad Agraria La Molina. 874 p

Castañares, A., C. (1993). *Estudio de la patogenicidad y virulencia de cepas del hongo Beauveria bassiana sobre la broca del café Hypothenemus hampei*, Universidad Técnica de Oruro, Facultad de ciencias Agrícolas y Pecuarias. Tesis: Ingeniera Agrónoma (Bolivia). P. 118.

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ. (1995). *Avances técnicos*. Números: 114 al 184. Tomo II. Chinchiná, Caldas, Colombia. 243 – 254 p.

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ, (CENICAFE - COLOMBIA). (1996). *Práctica sobre el control de calidad a formulaciones de hongos entomopatógenos* In: *Seminario Internacional sobre Caficultura sostenible. "Manejo integrado de la broca del café "MIB*. Chinchiná, Caldas. Abril 17-19: 33.

Cordero, A., J. D. (1999). *Selección de cepas del hongo Beauveria bassiana (Balsamo) en laboratorio para el control de la broca del café, en diferentes pisos ecológicos de los yungas de La Paz*, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía .Tesis de Grado (Bolivia). P. 83

Fernández, L., O. (2007). *Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad*. Laboratorio de hongos entomopatógenos INISAV. Ciudad de La Habana Cuba. 10 p.

Little, T., M.; Hills, F., J. (1990). *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. 2da. Ed. Trillas México D. F. 125 – 143 p.

López, B., C. (2003). *Evaluación de la patogenicidad de aislamientos del hongo Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) sobre la broca del café Hypothenemus hampei (Ferrari) en condiciones de Laboratorio*. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. Tesis: Ingeniero Agrónomo. 87 p.

Narvaez, M.; Gonzales G., M. T.; Bustillo P., A. E.; Chaves C., B.; Montoya R., E. C. (1997). *Producción de esporas de aislamientos de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae en diferentes sustratos*, Revista Colombiana de Entomología 23 (3 – 4): 125 – 132.

Perez, G., J. 2002. *Curso básico de cultivo de tejidos vegetales in Vitro aplicado a la producción agrícola*, Escuela Militar de Ingeniería, La Paz (Bolivia). P. 65.

SECRETARIA DE AGRICULTURA,
GANADERIA Y DESARROLLO RURAL. (1997).
*Taller de producción masiva de agentes de control
microbiano; taller organizado por el Centro
Nacional de Referencia de Control Biológico,*
Sociedad Mexicana de Control Biológico. Tecoman.
98 p.