



PROGRAMA DE MODERNIZACIÓN DE LOS SERVICIOS
AGROPECUARIOS

CENTRO DE
INVESTIGACIÓN DE
LA CAÑA DE AZÚCAR
DEL ECUADOR



CINCAE

PUBLICACIÓN TÉCNICA No. 5

GUIA PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae*

Patricia Gómez Pereira
Jorge Mendoza Mora



El Triunfo, Guayas, Ecuador
Octubre del 2004

GUIA PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae*

Patricia Gómez Pereira
Jorge Mendoza Mora

I. INTRODUCCIÓN

En algunas ocasiones, el ataque de insectos plagas constituye una de las causas de la baja producción y rendimiento de la caña de azúcar. En Ecuador, existen varias especies de insectos que pueden afectar el cultivo, siendo las más importantes el saltahojas, *Perkinsiella saccharicida* y el salivazo, *Mahanarva andigena* (Mendoza, 2001; Mendoza, et. al, 2001).

En un esfuerzo por evitar tales problemas, los cultivadores de caña vienen utilizando insecticidas químicos, como única alternativa para controlar estas plagas. Esta práctica, lejos de ser una solución duradera, económica y ecológica, ha traído como consecuencia la ruptura del equilibrio biológico del agro-ecosistema, con manifestaciones evidentes de resurgencia de plagas claves, surgimiento de nuevas plagas y, problemas relacionados con la salud y el medio ambiente (Mendoza. 2001).

Esta situación está demandando la búsqueda de nuevas alternativas de control que sustenten el desarrollo de una agricultura sostenible. En varios países, el uso de hongos entomopatógenos es una alternativa que se ha venido abriendo espacio en los programas de manejo de plagas en caña de azúcar. Estos microorganismos poseen la capacidad de regular las poblaciones de algunos insectos plagas (Rodríguez y Sáenz, 2000; Estrada y López, s.f.; Mendonca, 1996).

Actualmente, se conocen más de 700 especies de hongos que afectan a insectos de diversos órdenes (Devoto, Gerding y France, 2003); algunos de los cuales, están siendo utilizados exitosamente en programas de control biológico (Monzón. 2001). Por ahora, el grupo más importante de hongos entomopatógenos, con fines prácticos de manejo, esta constituido por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Monzón. s.f.). En el caso de *M. anisopliae* es un patógeno que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes, entre los cuales se encuentran el saltahojas, *Perkinsiella saccharicida*, y diversas especies de salivazo que afectan la caña de azúcar (Mendonca, 1996; Alves, 1998; Mendoza, 2003).

El trabajo realizado hasta ahora con *M. anisopliae* en el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE), ha permitido establecer una metodología para la producción de este entomopatógeno con miras a su utilización en programas de manejo integrado de plagas en caña de azúcar.

II. PROCESO DE PRODUCCION

1. Recolección de muestras en el campo

Para la obtención de cepas del entomopatógeno se hacen recolecciones en el campo de insectos muertos que presenten síntomas o signos del patógeno que se desea aislar (micelio o esporulación). Estos insectos se colocan individualmente en frascos de vidrio, cajitas o fundas plásticas, limpias o esterilizadas, y se trasladan al laboratorio. Aquí se hace una desinfección de los especímenes, sumergiendo en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, durante 2 minutos, y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril (ADE). Posteriormente se colocan sobre papel filtro estéril para extraer el exceso de humedad. Una vez desinfectados los especímenes, se colocan en cajas petri acondicionadas como cámara húmeda estériles, con papel filtro, una bolita de algodón humedecido y dos portaobjetos colocados en cruz, sobre los cuales se colocan los especímenes desinfectados (Figura 1).



Figura 1. Cámara húmeda (A), crecimiento de micelio (B) y esporulación de *M. anisopliae* (C) sobre adultos de *Perkiensiella saccharicida*

2. Aislamiento

Para los aislamientos se toman los insectos de la cámara húmeda que presenten una esporulación uniforme y estén libres de contaminantes (Figura 2). Este aislamiento se puede efectuar de dos maneras: En el primer caso se prepara una suspensión retirando las conidias del cuerpo del insecto y colocándolas en un frasco con 9 ml de ADE una gota de Tween 20. A partir de esta suspensión se hacen siembras en el medio de cultivo con la ayuda de un asa de platino. En el otro caso se retiran las conidias del insecto con el asa de platino y se siembran directamente utilizando la técnica del rayado sobre el medio de cultivo. El aislamiento se efectúa en cajas petri o tubos de ensayo conteniendo PDA¹ (papa, dextrosa y agar) más extracto de levadura. Para evitar el crecimiento de bacterias se agrega una gota de ácido láctico sobre el medio de cultivo en cada caja petri o tubo de ensayo. Las cajas petri se sellan con parafilm y los tubos de ensayo con algodón y papel aluminio (Figura 3). Posteriormente se colocan en una incubadora a 27 °C con luz permanente.

^{1/} 200 g de papa, 20 g de dextrosa, 15 g de agar, 5 g de extracto de levadura y 1000 ml de agua destilada



Figura 2. Adulto de salivazo cubierto con micelio y conidias de *Metarhizium anisopliae*.

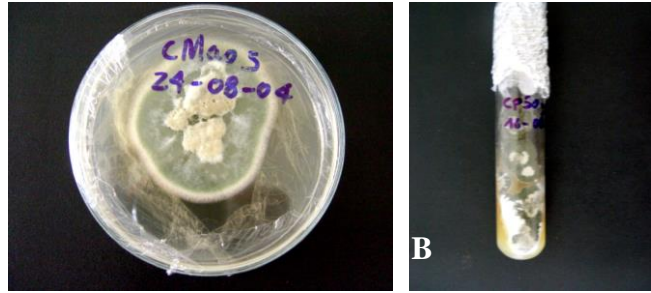


Figura 3. Aislamientos de *M. anisopliae* en caja petri (A) y tubo de ensayo (B)

3. Reactivación

Partiendo de una cepa seleccionada, sea nativa o introducida, es necesario mantener la patogenicidad y virulencia de este organismo a través de dos reactivaciones al año. Para esto se utilizan insectos vivos procedentes de la cría del laboratorio o del campo, que no muestren síntomas de afectación por algún patógeno. Para el caso del salivazo se desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, durante 2 minutos, y se enjuagan por tres ocasiones con ADE; luego se colocan sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de humedad y posteriormente se inoculan con el hongo. El método de inoculación consiste en sumergir el insecto en una suspensión de 1×10^8 conidias/ml o pasar una pincelada en el dorso del mismo. Los insectos inoculados son colocados individualmente en cajas petri, proporcionándoles humedad y alimento hasta que se produzca la muerte del mismo. En el caso de Perkinsiela, se paralizan momentáneamente colocándolas en la nevera durante 33 a 45 segundos e inmediatamente se inoculan haciendo una pulverización con un atomizador manual. Posteriormente se colocan sobre papel filtro para eliminar el exceso de humedad y se transfieren a jaulas entomológicas en donde se las mantiene con pedazos de hojas de caña desinfectadas hasta que se produzca la muerte del insecto. Los insectos muertos son acondicionados en cámara húmeda (caja petri) como se indicó anteriormente, para que se produzca el desarrollo y la esporulación del hongo.

4. Producción del inóculo en cajas petri

Una vez obtenida la colonia pura del patógeno se prepara una suspensión de conidias y con la ayuda de un esparcidor o rastrillo de vidrio se siembran sobre el medio de cultivo (PDA más extracto de levadura). Las cajas petri se sellan con parafilm y se colocan en una incubadora a 27 °C, donde permanecen con luz continua durante 15 días, tiempo en el cual el hongo completa su desarrollo y alcanza a esporular completamente (Figura 4). Una vez esporulado el hongo, y mientras permanecen en la incubadora, se retira el parafilm de las cajas petri para que la colonia vaya perdiendo humedad y se mejore el intercambio gaseoso. Posteriormente, estas cajas pasan a la refrigeradora (4 a 8 °C) en donde pueden conservarse hasta seis meses.

5. Preparación de matrices

Para formar las matrices se utilizan Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de PDA más extracto de levadura y dos gotas de ácido láctico. En estas matrices se siembra el inóculo proveniente de las cajas petri llenas. Para ello se prepara una suspensión con una concentración de alrededor de 1×10^8 conidias/ml, de la cual se toman 2 ml para inocular cada matriz. Estas se colocan en la incubadora o en un ambiente a 27 °C, con luz permanente o fotoperiodo normal. Al cabo de 15 días el hongo estará completamente esporulado y podrá ser utilizado en la producción masiva del mismo (Figura 5).



Figura 4. Producción de inóculo en caja petri.

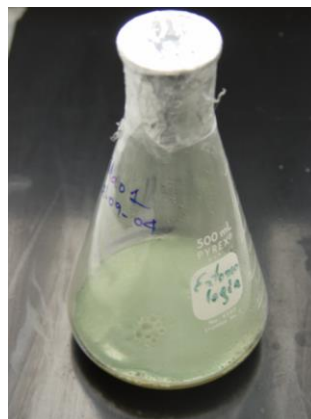


Figura 5. Matrices sólidas para producción de *M. anisopliae*

6. Preparación del sustrato

Para la producción masiva del hongo se utiliza arroz precocido. Para preparar este sustrato se coloca el arroz en una olla con agua en estado de ebullición, por el lapso de 5 a 10 minutos. El arroz precocido debe mostrar una consistencia suave y que quiebre con facilidad al ser partido con la uña. Posteriormente, este arroz es transferido a una zaranda para escurrir el exceso de humedad y enfriarlo. El arroz precocido se puede colocar en botellas de vidrio, fundas de polipropileno o tarrinas autoclavables. En el CINCAE se utiliza fundas de polipropileno de 8" x 12", con capacidad para 400 g de arroz precocido. Las fundas se cierran haciéndoles tres dobleces y sellándolas con grapas. El material así preparado, se esteriliza en autoclave a 121°C con 15 psi, durante 30 minutos. Después de esterilizar las fundas, se deben remover con el objeto de evitar aglomeraciones del arroz y facilitar el crecimiento del hongo.

7. Inoculación del sustrato

A partir de cada matriz sólida se prepara 500 ml de una suspensión de conidias del hongo, que puede tener una concentración de 1×10^8 conidias/ml. Inicialmente se agrega 100 ml de ADE + Tween 20 al 0.05%, con el cual se hace un primer lavado de las conidias de la matriz, posteriormente se hacen otros lavados sucesivos hasta completar 500 ml de suspensión del hongo. A esta suspensión se le agrega 62.5 mg de cloranfenicol, para evitar el crecimiento de bacterias. Para la inoculación del sustrato se utilizan 5 ml de esta suspensión por funda (Figura 6).

Las fundas inoculadas se trasladan al cuarto de crecimiento (Figura 7), donde permanecen expuestas a un fotoperiodo normal y con una temperatura de 26 a 28 °C. Al tercer o cuarto día se remueve el contenido de las fundas para lograr un crecimiento uniforme y una buena esporulación. Al cabo de 15 días el sustrato con el hongo esporulado es trasladado al cuarto de secado.



Figura 6. Cámara de aislamientos (A) y cámara de flujo laminar (B) utilizadas en los procesos de aislamiento e inoculación de hongos entomopatógenos.



Figura 7. Colocación de las fundas inoculadas en el cuarto de crecimiento y esporulación de *M. anisopliae*

8. Secado del producto

El sustrato con el hongo proveniente del cuarto de crecimiento se coloca en el cuarto de secado, a una temperatura no mayor de 28 °C, con baja humedad relativa (<70%) y sin entrada de rayos solares. Un cuarto con acondicionador de aire provee las condiciones adecuadas para el secado de este material. El material se esparce sobre papel periódico y sobre un plástico negro, manteniéndose por 12 días, hasta que el contenido de humedad descienda al 12 ó 14% (Figura 8). En estas condiciones el material es enfundado en recipientes de 1 Kg (Figura 9) y estará listo para ser utilizado directamente en las aplicaciones en el campo ó almacenarse en refrigeración (4 a 8°C). En este último caso, el hongo puede permanecer viable hasta por 6 meses.



Figura 8. Sistema para el secado del sustrato arroz- hongo.



Figura 9. Enfundado del producto final

III. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS O PRUEBAS DE CALIDAD

1. Concentración de esporas

Para la cuantificación de la concentración de esporas se toman cuatro submuestras de un gramo de arroz-hongo, de cada lote de producción. Cada submuestra se coloca en un frasco con 10 ml de ADE más una gota de Tween 20, que constituye la suspensión madre. Luego, de cada suspensión madre se toma 1 ml y se coloca en un segundo frasco que contiene 9 ml de ADE, con lo cual queda preparada la dilución 1×10^{-1} . Posteriormente se repite este procedimiento hasta obtener una dilución de 1×10^{-3} (Figura 10), la que permite contar el número de conidias en la cámara de Neubauer o Hemocitómetro. El conteo de conidias se hace en cinco campos (los cuatro de las esquinas y el central) de la cámara de Neubauer (Figura 11 y 12.). Se suma la cantidad total de los cinco campos y se obtiene el promedio. Este valor se multiplica por 50.000 que es el factor de la cámara, por el inverso de la dilución, que en este caso será 10^3 y por el volumen de la suspensión madre (10 ml). Este valor será el estimado del número de conidias por gramo de arroz.



Figura 10. Procedimiento para preparar las diluciones seriadas a partir de la suspensión madre.

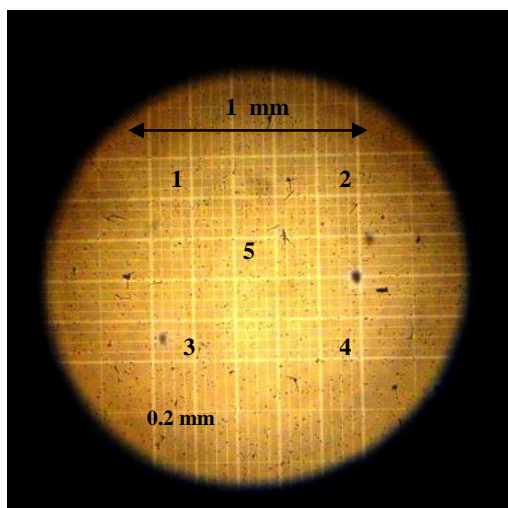


Figura 11. Retículo de la cámara de Neubauer y cuadrados utilizados para el conteo de conidias

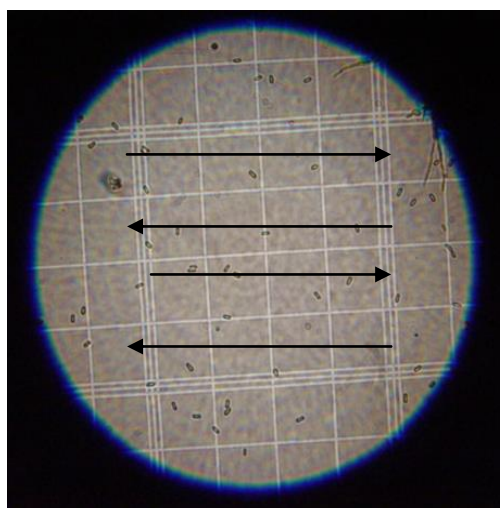


Figura 12. Conteo de conidias en uno de los cuadrantes centrales de la cámara de Neubauer. Las conidias que están sobre la línea derecha e inferior no se cuentan

2. Prueba de germinación

Esta prueba sirve para establecer la viabilidad del hongo y, en combinación con el estimado del número de esporas por gramo de arroz se puede calcular la cantidad de esporas viables por unidad de peso o volumen. Este estimado se hace con cada una de las cuatro submuestras preparadas para el conteo de conidias. Se prepara una caja petri para cada submuestra, con 15 ml de agar-agua, sin acidificar. Se marcan cinco puntos en la superficie externa inferior de la caja, que corresponden a los puntos en los cuales se depositan las alícuotas que contienen las esporas. De la dilución 1×10^{-3} de cada submuestra preparada para la prueba anterior, y previamente agitada, se toman cinco alícuotas de 5 ul, para depositar sobre el medio de cultivo, en los puntos que fueron marcados en la caja petri (Figura 13). Las cajas petri inoculadas se incuban en un cuarto a 27°C , durante 20 a 24 horas. Transcurrido este tiempo se agrega una gota de azul de lactofenol a cada alícuota con el propósito de detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo (Figura 14). Luego, se cortan las alícuotas depositándolas sobre una lamina porta objetos y se coloca un cubreobjeto (Figura 15). La observación se hace con el objetivo de 40 X contando un mínimo de 100 esporas (germinadas y no germinadas), por alícuota (Figura 16). Con los datos obtenidos en las cuatro submuestras se calcula el porcentaje de germinación.



Figura 13. Depósito de las alícuotas de la suspensión del hongo en la caja petri para la prueba de germinación

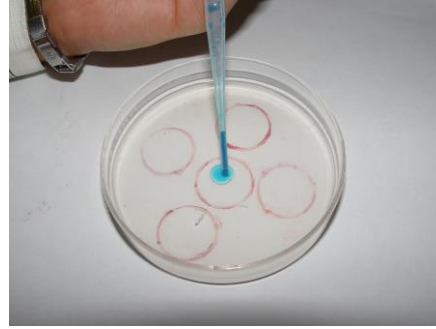


Figura 14 Tinción con azul de lactofenol de las conidias de *M. anisopliae*.

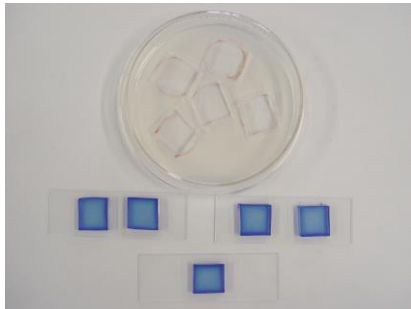


Figura 15. Preparación de placas para el conteo de conidias germinadas y no germinadas

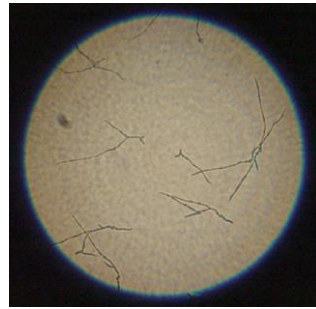


Figura 18. Conidias de *M. anisopliae* germinadas y no germinadas, 24 horas después de la inoculación en agar- agua, (objetivo de 40 X).

3. Prueba de pureza

La prueba de pureza tiene como propósito establecer la proporción del agente biológico e identificar los contaminantes, ayudando a mejorar el proceso de producción del entomopatógeno. El medio Papa Dextrosa Agar (PDA) más cloranfenicol (0,016%) se prepara adicionando 1 ml de la solución de cloranfenicol (0.25 gramos de cloranfenicol en 100 ml de ADE) en 150 ml de PDA. Este medio se dispensa en cantidades de 10 a 15 ml por cada caja petri esterilizada. Luego se toman los tubos de la dilución 10^{-3} de cada submuestra, se agitan en el vortex durante un minuto y se toma 50 ul para inocular en cada caja, dispersando el inóculo con la ayuda de un rastrillo bacteriológico esterilizado. Las cajas inoculadas se incuban a una temperatura de 27° C, con el fin de promover el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Diariamente se cuenta el número de UFC de cada organismo durante 7 días, en todas las submuestras. Al final de las lecturas, se identifica cada uno de los microorganismos presentes y se anota el número de UFC de *Metarhizium anisopliae* y el número de UFC de otros microorganismos (hongos, bacterias y levaduras). Para el cálculo de pureza (P) se utiliza la siguiente formula:

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo deseado}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

IV. BIBLIOGRAFÍA

- ALVES, S. 1998. Controle microbiano de insetos. 2^{da} Ed. FEALQ, Piracicaba, Brasil, 1163 p.
- ALVES, S y PEREIRA, R. M. 1998. Producao de fungos entomopatogénicos. In S. B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2^{da} Ed. FEALQ, Piracicaba, Brasil, 1163 p
- DEVOTO, L; GERDING, M y FRANCE. 2003. Hongos entomopatógenos: Una alternativa para la obtención de biopesticidas. Informativo Agropecuario, BIOLECHE-INIA QUILAMAPU.
[http:// www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html](http://www.inia.cl/cobertura/quilamapu/bioleche/BOLETIN23.html)
- ESTRADA, J y LOPEZ, M.T. (s.f.). Los Plaguicidas en la Agricultura Sostenible Cubana. Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical Alejandro de Humboldt (INIFAT). C. De la Habana. p. 1-2
- GUTIERREZ, G. 1993. Manual de Instrucciones para Determinar la DL⁵⁰, como Criterio para Evaluar Resistencia. Managua, Nicaragua, D.D.F/SAVEIMAG. 23.p.
- MARIN, P y BUSTILLO, A. 2002. Pruebas microbiológicas y físico-químicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos. In. Memorias del Curso Internacional Teórico – Práctico sobre Entomopatógenos, Parasitoides y otros Enemigos de la Broca del Café. CENICAFE, Chinchiná, Colombia, marzo 11 al 15 del 2002. 72-116 p
- MENDONCA, A.1996. Pragas da cana de acucar. Maceico, Brasil. Insectos & CIS. 239 p.
- MENDOZA, J; MARTINEZ, I; ALVAREZ, A.M; AYORA, A y LUZURIAGA, V. 2001. Manejo del Saltahojas de la Caña de Azúcar, *Perkinsiella saccharicida* (Homoptera: Delphacidae), en el Ecuador. Memorias. Primer Taller Latinoamericano Sobre Plagas de la Caña de Azúcar. Guayaquil-Ecuador. p. 17-22.
- MENDOZA, J. 2001. Bioecología del Salivazo de la Caña de Azúcar, *Mahanarva andigena* (Homoptera: Cercopidae); en el Ecuador. Memorias. Primer Taller Latinoamericano sobre Plagas de la Caña de Azúcar. Guayaquil, Ecuador. p. 40-42.
- MENDOZA, J. 2003. Control Biológico del Salivazo de la Caña de Azúcar, *Mahanarva andigena*. In Memorias del Primer Seminario Nacional de Control Biológico Universidad de Cuenca, Ecuador. P. 15-16.

- MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de plagas, CATIE. Costa Rica. No.63. pp 95-103.
- MONZÓN, A. (s.f.). Producción y uso de hongos Entomopatógenos. FUNICA; CATIE. Nicaragua.63p.
- RODRÍGUEZ, D.1992. Hongos Entomopatógenos Contribución del Programa Nacional de Entomología del ICA. Bogota (Colombia). p. 78-79.
- RODRÍGUEZ, A y SAEN, C. 2000. Uso biológico del *Metarhizium anisopliae* (METCH) SOROK, como estrategia para el control de salivazo (Hom.: Cercopidae), en la caña de azúcar. DIECA-LAICA. Costa Rica. p. 1-2.
- ROGG, H. 1998. Guía práctica de producción masiva del entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control biológico de insectos plaga y vectores en Bolivia. Universidad “Autónoma Gabriel René Moreno”, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 36 p.

ANEXO

De acuerdo al proceso establecido para la producción de *Metarhizium anisopliae*, el laboratorio debe disponer de las siguientes salas o ambientes: sala para matrices, sala para preparación del sustrato, sala para inoculación, sala para crecimiento del hongo y sala para el secado. Los requisitos mínimos en cada una de estas salas son los siguientes:

Sala para matrices. En esta sala se mantienen las matrices, para lo cual se puede disponer de una incubadora a 27 °C y con luz permanente. Si no se dispone de la incubadora, las matrices se pueden mantener al ambiente con temperatura de 26 a 28 °C. Además, en esta sala se debe disponer de una nevera, un microscopio y la cámara de Neubauer.

Sala para preparación de medios de cultivo y el sustrato de arroz. En esta sala se realiza el proceso de preparación de los medios de cultivos y, el precocido y esterilización del arroz. Los equipos necesarios para este proceso son el autoclave, una cocina industrial de dos hornillas, una balanza electrónica y una refrigeradora. Los medios de cultivo, antibióticos y el agua destilada estéril se deben conservar en refrigeración (4 a 8°C).

Sala para inoculación. En esta sala se efectúan los aislamientos e inoculación del hongo en los medios de cultivo (cajas petri, matrices) y en el sustrato de arroz. Para este proceso se requiere de una cámara de flujo laminar o una cámara de aislamiento con luz ultravioleta, un mechero a gas o alcohol, un plato agitador calentador y un vortex. Esta sala debe disponer de un acondicionador de aire y se debe mantener en condiciones de asepsia.

Sala para crecimiento del hongo. En esta sala se mantienen las fundas inoculadas durante el tiempo que requiere la fase de crecimiento y esporulación del hongo. Las fundas se colocan individualmente en los estantes metálicos evitando su aglomeración. Esta sala se debe mantener entre 26 a 28°C, humedad relativa del 80% y fotoperiodo de 8 horas. Para mejorar las condiciones de humedad de esta sala se recomienda el uso de un humidificador.

Sala de secado del hongo. Esta sala debe ser independiente de las otras salas, debe tener buena ventilación, temperatura no mayor a 28 °C, humedad relativa menor a 70 % y no permitir la entrada de rayos solares, para esto se puede colocar en las ventanas una película antisolar. Para mejorar las condiciones de secado de esta sala se puede disponer de un acondicionador de aire encendido.

Nota: Todas las salas requieren de buenas condiciones de limpieza y desinfección, especialmente las salas para mantenimiento de matrices, inoculación y crecimiento del hongo. Esta desinfección debe hacerse diariamente con una mezcla de amonio cuaternario, a razón de 13 ml por litro de agua; ó, hipoclorito de sodio al 0.25 %.

CINCAE

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador

Km 49.6, vía Durán – Tambo
Teléfonos: 593-4-2729162/...67, Ext. 318
099-914464