

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**PRODUCCIÓN ARTESANAL DE *Beauveria Sp.* USANDO DIFERENTES
SISTRATOS SOLIDOS COMO MEDIO DE CULTIVO**

POR:

KELVIN ARTURO SANCHEZ MELGAR.

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA.

**COMO REQUISITO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO.**



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A.

MAYO, 2016.

PRODUCCIÓN ARTESANAL DE BEAUVERIA USANDO DIFERENTES
SUSTRATOS SOLIDOS COMO MEDIO DE CULTIVO

POR:

KELVIN ARTURO SANCHEZ MELGAR.

ESMELYM OBED PADILLA AVILA M. Sc

Asesor Principal.

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A

MAYO, 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

Reunidos en la Sección de Frutales del Departamento Académico de Producción Vegetal de la Universidad Nacional de Agricultura: **M. Sc. ESMELYM OBED PADILLA, ING. PORFIRIO BISMAR HERNÁNDEZ, ING. REINANDO ELISEO FLORES**, Miembros del Jurado Examinador de Trabajos de P.P.S.

El estudiante **KELVIN ARTURO SANCHEZ MELGAR** del IV Año de la Carrera de Ingeniería Agronómica presentó su informe.

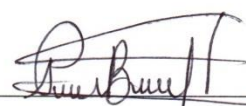
**“PRODUCCIÓN ARTESANAL DE *Beauveria* sp. USANDO DIFERENTES SUSTRATOS
SÓLIDOS COMO MEDIO DE CULTIVO”**

El cual a criterio de los examinadores, Aprobó este requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

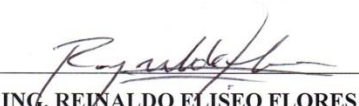
Dado en la ciudad de Catacamas, Olancho, a los ocho días del mes de junio del año dos mil dieciséis.


M. Sc. ESMELYM OBED PADILLA

Consejero Principal


ING. PORFIRIO BISMAR HERNÁNDEZ

Examinador


ING. REINALDO ELISEO FLORES

Examinador

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO, porque él es grande y en todo momento por muy difícil que haya sido la situación él estuvo conmigo.

A MI MADRE, FIDELINA MELGAR, por cada momento de apoyo y por darme el voto de confianza para poder culminar con mis estudios y poder enfrentarme a la vida pero sobre todo por su paciencia, y por cada lágrima que toco derramar.

A MI ABUELA, ADILIA MARTINEZ, por siempre apoyarme y nunca dejo de creer en mí y siempre estuvo en mis momentos más malos para brindarme su apoyo incondicional.

A MI PADRE, CARLOS SÁNCHEZ, por todo su apoyo moral cuando más lo necesite y por su paciencia a lo largo de mi carrera.

A MIS, HERMANOS, Cristian Sánchez, Carlos Sánchez y Jeffrey serrano por siempre apoyarme y ser mi inspiración este es por ustedes.

A MIS AMIGOS,, por todo el tiempo que compartimos y los que a la distancia estuvieron a lo largo de la carrera.

AGRADECIMIENTO

A DIOS QUE ES EL DUEÑO DE TODO, y sin Él no podría haber alcanzado la meta, por brindarme salud, sabiduría, fuerza para poder soportar tanto sacrificio.

A MI CASA DE ESTUDIOS, Universidad Nacional de Agricultura, por el aprendizaje que me brindo por estos cuatro largos años,

A MI MADRE, Fidelina Melgar, porque si no es por el gran sacrificio que ella realizo todo este tiempo, yo hubiera podido avanzar en mis estudios. Gracias Mami!!!

A MIS ASESORES DE TESIS, MSc ESMELIM OBED PADILLA AVILA Ing. PORFIRIO HERNANDEZ, Ing. REINALDO FLORES, por haberme permitido desarrollar mi trabajo de tesis y que por sus experiencias aprendí mucho de ellos.

A LOS ASISTENTES DE LABORATORIO, DOUGLAS IRIAS, por estar a la disposición de orientarme a lo largo de mi investigación con sus conocimientos.

A MIS COMPAÑEROS, Carlos Reginaldo. Mariano Sobalbarro, Engell Suazo, Noel Mondragón porque de una u otra forma estuvieron pendientes en cualquier situación en que necesite de su ayuda.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1 General.....	2
2.2. Específicos	2
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
4.1. Origen	4
4.2. Historia.....	4
4.3 Clasificación taxonómica	4
4.4 Generalidades de <i>Beauveria bassiana</i>	5
4.4.1 Caracterización molecular de <i>Beauveria bassiana</i>	6
4.5. Modo de acción.....	6
4.6. Aplicación de <i>beauveria</i> spp.	7
4.6.1 <i>beauveria</i> spp como Control Biológico	8
4.7. Ventajas de los hongos entomopatógenos	9
4.8 Sustratos de crecimiento	10
4.8.1 Aserrín de pino	10
4.8.2 Bagazo	11
4.8.3 Pulpa de café.....	12
4.8.4 Maíz	14

4.8.5	Arroz.....	14
3.9.6	Sorgo.....	15
4.9	Complementos	15
4.9.1	Melaza	16
V.	MATERIALES Y MÉTODO	17
5.1	Localización geográfica del estudio.....	17
5.2	Materiales y equipos	17
5.3	Materia prima.....	17
5.4	Desinfección del laboratorio y las instalaciones	18
5.5.1	Desinfección de la cámara de inoculación	18
5.5.2.	Cultivo del inóculo	19
5.5.2	Preparación del inóculo	19
5.5.3	Preparación del sustrato sólido	19
5.5.4	La desinfección de sustrato.....	20
5.5.5	Ajuste de la humedad	20
5.5.6	Siembra del inóculo en el sustrato.....	20
5.6	Diseño experimental	21
5.7	Fermentado del sustrato	21
5.8	Variables a evaluar.....	21
5.8.1	Medición del grado de colonización del hongo <i>Beauveria sp.</i>	21
5.8.2	Secado del sustrato fermentado	22
5.8.3	Conteo de conidios por gr de sustrato	22
5.8.4	Pruebas de viabilidad.....	23
VI	RESULTADOS Y DISCUSION	24
6.1	Colonización de sustrato por día.....	24
6.2	cantidad de conidios por gramo de sustrato	26
6.3	porcentaje de viabilidad	27
6.4	Porcentaje de Viabilidad en tratamiento de rayos ultravioleta	29
VII	BIBLIOGRAFÍAS	34
VIII	ANEXOS	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Composición química del aserrín de pino	11
Cuadro 2 Composición química del bagazo	12
Cuadro 3 Composición química de la pulpa de café	13
Cuadro 4 Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)	14
Cuadro 5 Composición química del arroz	15
Cuadro 6 Composición química del sorgo	15
Cuadro 7 Análisis químico proximal de melaza	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Crecimiento de micelio del hongo <i>Beauveria spp.</i> Según el sustrato solido evaluado como medio de cultivo	25
Figura 2 Numero de conidios por gramo de sustrato hongo <i>Beauveria spp.</i> Evaluadas con Sustratos solido evaluado como medio de cultivo	27
Figura 3 Porcentaje de viabilidad del hongo <i>beauveria spp.</i> En los diferentes sustratos evaluados	28
Figura 4. Evaluación del porcentaje de viabilidad del hongo a exposición de rayos ultravioleta en seis diferentes sustratos sólidos y melaza como complemento.	30

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Preparación y esterilización del sustrato	37
Anexo 2	Preparación del inóculo.	37
Anexo 3	Medición de crecimiento de micelio	38
Anexo 4	Preparación de las disoluciones	38
Anexo 5	Conteo de conidios para calcular el porcentaje de viabilidad	39
Anexo 6	Análisis de Varianza para la variable Crecimiento de micelio	39
Anexo 7	Análisis de Varianza para la variable Número de conidios/gr de Sustrato	41
Anexo 8	Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de viabilidad	42

RESUMEN

La investigación se realizó en las instalaciones del INSTITUTO NACIONAL DE FORMACIÓN PROFESIONAL (INFOP) ubicado en el municipio de La Paz, departamento de La Paz, con el objetivo de evaluar diferentes sustratos sólidos como medio de cultivo en la producción masiva de *beauveria spp*. Y determinar cuál es el más aceptable y con mejor potencial para esta multiplicación. Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. El objetivo es que el INFOP adopte esta tecnología para que pueda ser impartida a los alumnos de este centro y de esta manera ponerla a disposición de los pequeños agricultores por medio de ellos que son futuros extensionistas haciendo uso de productos orgánicos al alcance de ellos y reducir el uso de agroquímicos. Para ello se utilizaron diferentes granos, arroz, Maíz y sorgo, desechos forestales, aserrín de pino, y desechos agrícolas, pulpa de café y bagazo de caña azúcar, y melaza de caña de azúcar como complemento. Los cuales fueron inoculados con el hongo (*beauveria spp*). Para la realización del estudio fue necesario el aislamiento de la cepa propagativa del hongo (*beauveria spp*). Selección de los sustratos y complementos a evaluar, y establecer las condiciones artesanales para montar las unidades experimentales. Entre las variables evaluadas tenemos el crecimiento de micelio en el sustrato; otra de las variables evaluadas fue el número de conidios por gramos de sustrato el cual se realizó el conteo en el hematocimetro de Neubauer; la última de las mediciones correspondió al porcentaje de viabilidad de conidios. Para la evaluación del crecimiento de micelio se realizó la inoculación de *Beauveria spp* en cada uno de los sustratos, el mejor tratamiento para crecimiento fue generado por la combinación de Sorgo precocido+agua con 290.06 cm^2 , para la variable número de conidios el tratamiento que generó un mejor comportamiento es Arroz+agua con una media de 7.59×10^8 conidios/gr de sustrato. En cuanto al porcentaje de viabilidad se refiere, decimos que Maíz precocido+melaza es el tratamiento que mejor media presentó con 92.3% de conidios viables. Para realizar el proceso de reproducción masiva se concluye dar mayor prioridad a la variable número de conidios, debido a que al hacer la relación matemática entre las variables Número de conidios-% de viabilidad, obtenemos como resultado que la cantidad de conidios viables que se generan en los diferentes tratamientos presenta el mismo comportamiento observado en las pruebas de medias de número de conidios.

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción agrícola busca alternativas, al uso intensivo de insumos inorgánicos y el desarrollo de sistemas que incluyan la contribución de organismos que mejoren las características orgánicas y químicas del suelo. Uno de estos organismos benéficos son los hongos entomopatógenos.

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ó *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*. Las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* Este género se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazando hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo 2001).

Beauveria bassiana es uno de los HE más usados a nivel mundial para el control de insectos plaga en la industria agrícola y forestal. La razón de esta preferencia reside en su amplio rango de acción de cerca de 750 especies de insectos, así como el alto grado de conocimiento a nivel molecular entre la interacción hospedero-patógeno del desarrollo del sistema de producción de este hongo

II. OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar los sustratos arroz, sorgo, maíz, aserrín bagazo de caña y puplpa de café como medio de cultivo y melaza como complemento para la producción artesanal de *Beauveria spp.*

2.2. Específicos

Describir los niveles de crecimiento y colonización que presenta el hongo en los diferentes materiales usados como sustrato.

Determinar el efecto de algunos complementos utilizados en la producción de hongos.

Determinar si existe una correlación entre el sustrato utilizado y la viabilidad de los conidios.

Identificar el material que como sustrato genera mayor producción de conidios.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

La utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura como un método de control biológico ha ido en aumento en los últimos años, debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas. Hoy día existen en el mercado mundial insecticidas biológicos a base de hongos, bacterias y virus. No obstante de los aproximadamente 100 géneros y 800 especies de hongos entomopatógenos que han mostrado actividad contra diferentes insectos. (Thacker, 2002), solo pocos son utilizados comercialmente como agentes de control, siendo los más utilizados *Beauveria* (Zurek y Keddie, 2000; Mulock y Chandler, 2000; Leite, Batista, Almeida y Alves, 2003) y *Metarhizium*. (Ferron, Fargues y Riba, 1991; Leite et al., 2003)

El hongo *Beauveria bassiana* es utilizado exitosamente en muchas regiones del mundo, como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas, por sus características patogénicas para controlar insectos, por su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso (Esperanza, Gerding y France, 2008), ambientalmente favorable y sin efectos tóxicos. (Baeteman, 1997)

El hongo *Beauveria bassiana* es utilizado exitosamente en muchas regiones del mundo, como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas, por sus características patogénicas para controlar insectos, por su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso (Esperanza, Gerding y France, 2008), ambientalmente favorable y sin efectos tóxicos. (Baeteman, 1997)

4.1. Origen

En 1835, Agostino Bassi fue el primero en describir a *Beauveria* como agente causal del mal del segno, también conocido en Italia como calcinaccio o cannellino y como muscardino blanco en Francia. Este hongo fue el causante de la devastadora epizootosis que produjo importantes pérdidas económicas en la industria de la seda del sur de Europa, entre los siglos XVIII y XIX. La epidemia diezmo las poblaciones de larvas de gusanos de seda, y por ello se desarrollaron diversos estudios en este ámbito. En esta línea, Bassi se dedicó al estudio de *Beauveria*, y con ello, fue el primero en demostrar que los microbios pueden actuar como patógenos contagiosos de animales, una importante aportación a la teoría del germen de la enfermedad (Porter, 1973).

4.2. Historia

El primer reconocimiento taxonómico del hongo muscardino fue propuesto por Balsamo-Crivelli, quien en honor a Bassi, denominó al hongo *Botrytis bassiana*. El género *Beauveria*, en cambio, no fue descrito formalmente hasta 1912 por Vuillemin, y actualmente se engloba en la familia Cordycipitaceae, dentro del orden Hypocreales. *B. bassiana* presenta un aspecto algodonoso y tiene una coloración blanca que en ocasiones torna a crema o amarillo anaranjado. Presenta fiálidas cortas y globosas en la base y estrechas en su parte superior, agrupadas normalmente en verticilos. Cada una de estas fiálidas porta un conidio en forma de balón (Vuillemin, 1912).

4.3 Clasificación taxonómica

Reino	Fungi
División	Mycota
Subdivisión	Eumycota
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales

Familia	Moniliaceae
Género	Beauveria Vuillemin
Especie	Beauveria bassiana

4.4 Generalidades de *Beauveria bassiana*

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniartii* ó *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. velata*. Las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *B. brongniartii* (De Lacroix) Siemszko (Bustillo 2001). Éste género se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazando hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo 2001). *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2.0-3.0µm) y estructuras conidióforas que forman densos grupos (Samson *et al.*, 1988).

Las esporas son esféricas y levemente ovaladas en medios aerobios, pero más ovaladas en medios anaerobios, llamadas blastósporas (Kouassi, 2001). Sin embargo, indiferentemente de su morfología, presentan igual capacidad de infección. Tanto las esporas como las hifas, no son pigmentadas (hialinas), por lo que su apariencia es blanquizca para el ojo humano (Barron, 2001).

Beauveria es un género muy cosmopolita que engloba a hifomicetes haploides que habitan en el suelo de forma natural. *B. bassiana* es el hongo entomopatógeno con más representación en los suelos españoles, tanto cultivados como naturales, de hecho existe un estudio sobre la distribución de este hongo en la península y como las características del terreno afectan a dicha distribución. Según este estudio, *B. bassiana* tiene predilección por suelos con bajo contenido en materia orgánica y preferiblemente arcillosos, y suele localizarse por lo general en latitudes bajas y altitudes por debajo de los 700 m (Quesada-*et al.*, 2007).

4.4.1 Caracterización molecular de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es uno de los HE más usados a nivel mundial para el control de insectos plaga en la industria agrícola y forestal (Inglis et al., 2001). La razón de esta preferencia reside en su amplio rango de acción de cerca de 750 especies de insectos, así como el alto grado de conocimiento a nivel molecular entre la interacción hospedero-patógeno del desarrollo del sistema de producción de este hongo (Feng *et al.*, 1994)

4.5. Modo de acción

Presenta la habilidad de vivir de manera parasítica y saprofítica, lo que le permite sobrevivir en presencia o ausencia de insectos huésped, respectivamente. Cuando se encuentra en el suelo en materia orgánica, su morfología micelial genera una red amplia y filamentosa originada a partir de un conidio; sin embargo, en presencia de un insecto huésped, el conidio germina y una vez dentro del insecto, pasa a formar una red de hifas, que una vez colonizada, pasa nuevamente a una forma similar a la de levadura (blastóspora) (Wong, 2003).

El ataque de este hongo sobre el insecto huésped, se realiza en diferentes etapas divididas en: adherencia, germinación, diferenciación y penetración (Kouassi, 2001)

El propágulo infeccioso del hongo (conidia) se deposita en la superficie del insecto (exoesqueleto) adhiriéndose a la misma (fase de adhesión), a continuación aparece el tubo germinativo (fase de germinación) y a partir de él, se desarrolla el apresorio, una estructura celular que ejerce presión contra las capas cerosas del exoesqueleto, al mismo tiempo que libera varios tipos de enzimas (quitinasas, cutinasas) las cuales producen la histólisis de los tejidos ablandándolos y permitiendo la infección del hongo (fase de infección). Dentro del hemocele el hongo coloniza y se dispersa en la hemolinfa, emitiendo al medio metabolitos secundarios del tipo micotóxico (beauvericina) los cuales afectan diferentes actividades fisiológicas y órganos vitales del insecto hasta producirle la parálisis y posteriormente, su

muerte en un lapso variable de entre 4 y 8 días. Finalmente el hongo concluye su ciclo al colonizar externamente al cadáver del insecto y producir y liberar al medio millones de conidias infectivas, que funcionarán como inóculo secundario para infectar a otros individuos.

Según Duperchy (2003), la adhesión del conidio a la cutícula del huésped, no es específica en muchos casos. Sin embargo, al parecer, la agresividad se encuentra relacionada con la actividad enzimática sobre los lípidos, ácidos grasos y la secreción de mucílago, que cumple la función de adhesión y de favorecer la actividad de las enzimas extracelulares

Adicionalmente, en algunas ocasiones se evidencia la actividad de sustancias no enzimáticas, como las beauvericinas, beauverolidasas, bassianolidasas e isarolidasas, que acentúan y aceleran el proceso de infección (Kouassi, 2001).

4.6. Aplicación de *beauveria* spp.

Las conidias del hongo son aplicadas de diferentes formas dependiendo de la ubicación del insecto, el desarrollo del cultivo y de las características topográficas del lugar. Para el control de insectos de follaje como los gusanos defoliadores, se recomienda asperjar una suspensión acuosa de conidias, de manera tal que las mismas sean depositadas idealmente sobre el insecto meta. Para tal efecto puede utilizarse tanto equipo terrestre (bombas de espalda, “boon” o cañón”). En el caso de insectos de suelo, se recomienda ya sea incorporar el material (hongo con sustrato) o aplicar una suspensión al suelo manera de “Drench”, tratando de hacer que las conidias penetren y alcancen a los insectos. Para otros insectos como el Picudo Rayado, el hongo se deposita sobre cebos atrayentes contenidos dentro de trampas tipo “bambú o galón”, esto con el objeto de que el insecto atraído se contamine con el hongo.

4.6.1 *beauveria spp* como Control Biológico

El hongo Bb presenta gran actividad entomopatógena en variados tipos de insectos alrededor del mundo, incluyendo los órdenes Coleóptera, Lepidótera, Homóptera y Arthropoda (Alcázar et al., 1999). Se han encontrado cepas con virulencia hacia importantes plagas, tanto para la agricultura como para los humanos. En la agricultura, se ha utilizado para el combate de la cucaracha de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), termitas y hormigas (*Acromyrmex sp*, *Atta sp*), broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*), oruga del pino (*Dendrolimus spp*), grillos verdes (*Nephotettix spp*) y la polilla (*Laspeyresia pomonella*) (Wong, 2003). También *Anthonomus grandis* del algodón, *Cosmopolites sordidus* del banano, *Ancognatha sp* y *Phyllophaga sp* de la papa, *Compsus sp* en ornamentales, *Cosmopolites sordidus* y *Pseudococcus sp* en piña, *Loxotoma elegans* en palma, *Trips sp*, ácaros en general y *Corytucha sp* en hortalizas y frutales, entre otras (EDAFON, 2005)

En el campo de la salud humana, cepas de Bb atacan la mosca tsetse (*Glossina morsitans*), mosquito de la arena (*Phlebotomus sp*) que transmite Leishmania, insectos del género *Triatoma* y *Rhodnius*, vectores de la enfermedad del mal de Chagas, y *Anopheles stephensi*, transmisor de la malaria (Wong, 2003).

4.6.2 Beauvericinas

Las toxinas producidas por el hongo *B. bassiana* fueron los primeros compuestos en ser caracterizados y aislados pertenecientes a una familia de péptidos conocidos como depsipéptidos (Logrieco et al., 1998). La acción insecticida de estos depsipéptidos es específica para cierto grupo de insectos, entre ellos muchas familias de lepidópteros. La toxicidad se debe a la acción sinérgica de un complejo de compuestos formando complejos de iones sodio (Na) y potasio (K) que permiten el incremento natural y artificial de las membranas. Muestra actividad antibiótica en contra de algunas bacterias como *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* (Ovchinnicov *et al.*, 1971)

La beauvericina es sintetizada de manera similar a las eniatinas y en su biosíntesis interviene una enzima multifuncional conocida como eniatina sintetasa cuya expresión es constitutiva (Billich y Zocher 1988). Dos ciclotetrapéptidos muy parecidos denominados beauverólidos H e I fueron aislados del micelio de *B. bassiana* mostrando una baja actividad insecticida contra lepidóteros, sin embargo algunos otros compuestos conocidos como beauverólidos L tienen una fuerte acción inmunomoduladora pero no un efecto insecticida (Jegorov *et al.*, 1994).

Otro metabolito aislado de *B. Bassiana* conocido como basianólido ha mostrado tener una fuerte acción insecticida contra larvas de gusano de seda *Bombix mori* (Kanaoka *et al.*, 1978).

4.7. Ventajas de los hongos entomopatógenos

- Selectividad: las cepas son especializadas para cada plaga y su patogenicidad aumenta cada vez que ataca otros individuos de la misma especie.
- Persistencia: En el suelo o en insectos muertos.
- Poco impacto ambiental.
- Poca toxicidad para el hombre y otros animales.
- No inducen resistencia.

La investigación sobre control biológico con hongos entomopatógenos está generando constantemente ideas sobre su uso en campo. Lo anterior permite optimizar las prácticas de

aplicación para aumentar la probabilidad del cumplimiento de su ciclo infeccioso, teniendo en cuenta factores como las condiciones ambientales más favorables al momento de la aplicación. También se han generado avances en la producción y almacenamiento, aspectos que se tornaban, hace tiempo, en desventajas en el uso de estos microorganismos (Madrigal, 2001)

4.8 Sustratos de crecimiento

Los sustratos utilizados varían según la región y la finalidad de la multiplicación. Se han probado arroz pelado, trigo, cebada, maíz partido, hollejo de cereales, pasto seco picado, entre otros

4.8.1 Aserrín de pino

Según estudios realizados por (López y Soto 2008). La composición química del aserrín es similar a la reportada por FAO (1997) para madera, Lee (1992) para materiales lignocelulósicos y Sjöström (1981) y Mosier *et al.* (2005) para madera blanda. Las diferencias encontradas dependen del tipo de biomasa, el lugar de crecimiento, los fertilizantes usados, el tiempo de cosecha y las condiciones de almacenamiento (de Boer y den Uil 1997). Coincidiendo con (Alvarez Godoy 1999).

Cuadro 1 Composición química del aserrín de pino en comparación con las reportadas por Sjöström (1981), Lee (1992), FAO (1997) y Mosier et al. (2005)

Componente	Experimentales (%)	FAO1 (%)	Lee2 (%)	Sjöström3 (%)	Mosier et al.4 (%)
Celulosa	--	40 - 55	30 - 60	40 - 45	46.4
Hemicelulosa	--	20 - 35	30 - 60	20 - 30	8.8
Carbohidratos	55.233 ±	60 - 90	60 - 90	60 - 75	55.2
totales	0.74	25 - 30	10 - 30	26 - 32	29.4
Lignina	26.58 ±	5 - 20	10 - 20	--	--
Extraíbles	0.41	0.2 - 2.0	--	--	--
Cenizas	24.41 ±				
	0.36				
	0.68 ± 0.02				
1madera, 2materiales lignocelulósicos y 3, 4maderas blandas					

4.8.2 Bagazo

Es un subproducto que queda al extraer el jugo de la caña. Está formado por dos tipos de tejidos: uno de formación más compacta llamado tejido fibroso y otro de constitución menos densa proveniente del parénquima vegetal, llamado meollo o bagacillo.

Composición química del bagazo

En el cuadro 2 se muestra la composición del bagazo fresco. El componente más importante del bagazo es la fibra cruda, la cual está básicamente constituida por lignocelulosa.

Cuadro 2 Composición química del bagazo

Item	%
Materia seca	55,0
Proteína bruta	1,3
Fibra bruta	40,0
Extracto etéreo	0,76
Extracto no nitrogenado	3,20
Cenizas	1,00

(Sierra, 2000).

La lignocelulosa es el complejo formado por lignina, celulosa y hemicelulosa que existe en una estrecha asociación física y química en las células vegetales. (Sierra, 2000).

4.8.3 Pulpa de café

La pulpa de café representa un desecho agroindustrial muy abundante y de bajo valor nutricional debido a la presencia de sustancias toxicas como la cafeína y los polifenoles. Se puede mejorar su valor nutritivo a través de una fermentación solida (FS) con hongos filamentosos capaces de detoxificar la pulpa de café utilizando la cafeína como fuente de nitrógeno y los polifenoles como fuente de carbono para su crecimiento. (Roussos S, Hannibal L. Y Nava G.)Anteriormente varios Investigadores utilizaron Anger para el enriquecimiento proteico de la pulpa de café adicionando nitrógeno mineral al sustrato obteniendo rendimientos satisfactorios en proteína sin obtener una degradación completa de la cafeína (Penaloza, *et al* 1981);

Cuadro 3 Datos obtenidos en estudio sobre la Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje (Noriega y Silva2009).

Componentes del mucilago	Composición química (%)
Materia húmeda (m.h)	
Humedad	85.0
Carbohidratos totales	7.0
Nitrógeno	0.15
Acidez (como ácido cítrico)	0.08
Compuestos insolubles en alcohol (AIS)	5.0
Pectina (como ácido galacturónico)	2.6
Materia seca (m.s)	
Sustancias pépticas	33
Azúcares reductores	30
Azúcares no reductores	20
Celulosa y cenizas	17

Fuente (Noriega y Silva2009).

4.8.4 Maíz

Cuadro 4 Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%)

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3,7	8,0	18,4
Extracto etéreo	1,0	0,8	33,2
Fibra cruda	86,7	2,7	8,8
Cenizas	0,8	0,3	10,5
Almidón	7,3	87,6	8,3
Azúcar	0,34	0,62	10,8

Fuente: Watson, 1987.

4.8.5 Arroz

Entre las fracciones del grano de arroz, el salvado posee el máximo contenido energético y proteico y la cáscara el mínimo. Las vitaminas del grupo B se concentran en las capas de salvado al igual que el α -tocoferol (Vit. E) y fósforo, como se puede ver el arroz elaborado pierde gran contenido de riboflavina (Vit.B2) llevándose la mayor parte el salvado de arroz Gómez 1978. De la misma manera establece una lista de componentes químicos (Cuadro 5) que posee el arroz.

Cuadro 5 Composición química del arroz

Componente químico	%
Materia Seca	88.2
Proteína	7.1
Fibra cruda	0.5
Cenizas	0.8
Energía Kcal	373

Fuente: Gómez 1978.

3.9.6 Sorgo

El grano de sorgo está constituido básicamente por proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y polifenoles (Cuadro 6), en porcentajes variables según genotipo y ambiente. El contenido de proteína del endospermo está más influenciado por la eficiencia en la absorción de Nitrógeno (N) y su traslocación a la semilla, que por la cantidad y forma de N aplicado al suelo. Las proteínas del sorgo son en general altas en los aminoácidos, leucina, ácido glutámico, alanina, prolina y ácido aspartico, siendo lisina, metionina y triptofano los más limitantes (Domanski *et al*, 1997)

Cuadro 6 Composición química del sorgo

Componentes químicos	%
Proteína	10.4
Fibra cruda	2
Carbohidratos	70.7
Ceniza	1.6
Energía Kcal	329

Fuente FAO 1995

4.9 Complementos

4.9.1 Melaza

Es un subproducto de la industrialización de la caña para la obtención de azúcar. La melaza representa de 25 a 34 Kg. por cada 1,000 Kg. de caña que entran al ingenio

4.9.2 Composición química

Las características más sobresalientes de la melaza (cuadro 5) son la ausencia de grasa y fibra, el bajo contenido de proteína cruda y el alto contenido de ceniza. Los componentes más variables parecen ser el potasio y el sodio MELAZA

Cuadro 7 Análisis químico proximal de melaza

Análisis químico proximal de melaza en porcentaje ítem	Porcentaje
Humedad	22,81
Proteína	1,56
Fibra	0,00
Grasa	0,10
Cenizas	6,75
E.N.N.	68,78

Fuente (laboratorio de nutrición animal ICA, 1969.)

V. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Localización geográfica del estudio

El experimento se realizó en las instalaciones Instituto Nacional de Formación Profesional (INFOP), ubicado a 3 Km al Norte de la ciudad de La Paz, en el departamento de la Paz, a un altitud de 630 msnm, una precipitación promedio anual de 116.9 mm y una temperatura promedio de 27.6 °C

5.2 Materiales y equipos

Los materiales que se utilizaron son placas Petri de 100mmx15mm, papel toalla, , bolsas de polipropileno, polipel, bandejas plásticas, agua destilada, papel parafina (sellar), balanza, bisturí, cubre y porta objetos, jeringas, alcohol 95%, alcohol de quemar, baldes, marcador permanente, maskin tape, grapadora, pinzas, zaranda, sacos, hielera, computadora portátil, cámara de flujo Laminar (biosafety class 2 labconco), , autoclave (All américa model 25x), calentadores (fisher Scientific.), ollas de aluminio de 30cm, 20 cm de diámetro, colador, refrigeradora, microscopio, paste de estereoscopio, libreta de campo, lápices, marcadores,

5.3 Materia prima

Granos de Maíz, Granos de Sorgo, Granos de Arroz, Bagazo de caña, Pulpa de Café, Aserrín, Cepas de *beauverias* spp. Y melaza

5.4 Desinfección del laboratorio y las instalaciones

El proceso de desinfección comenzó con la remoción de la materia orgánica presente en la infraestructura, herramientas y equipos a utilizar este proceso se realizó con detergente, luego se hizo el proceso de desinfección en la cual se realizó con hipoclorito de sodio comercial. Ambas soluciones se mezclaron con agua destilada. Después del lavado las herramientas y equipos se sometieron a una esterilización que se realizó con agua caliente a 100 °C durante 10 minutos. En algunos casos que los equipos son demasiado frágiles la esterilización se realizó en alcohol.

5.5 Manejo del experimento a nivel de laboratorio

5.5.1 Desinfección de la cámara de inoculación

La cámara de aislamiento se desinfecta antes de cada inoculación en el sustrato de agar, con alcohol al 70%, por dentro y afuera de la misma, se encendió el mechero y se mantuvo la cámara cerrada por término de un minuto, el mechero se mantuvo encendido en todo el proceso de siembra, luego se procedió a realizar los aislamientos; la desinfección personal se llevó a cabo siempre antes de realizar aislamientos y después de los mismos, y consistió con la aplicación por aspersión a la manos con alcohol al 70%. Como último paso para la desinfección es la utilización de la luz ultravioleta tipo C, con el objetivo de eliminar cualquier contaminante que haya ingresado al momento que se realiza el aislamiento.

5.5.2. Cultivo del inocular

En este paso procedimos a cultivar el hongo en placas Petri para obtener los conidios que serán inoculados en los siguientes sustratos. Se preparó el medio de cada 1000 ml de agua destilada, luego hecha la solución se pasó al calentador magnético que calienta y homogeniza la solución posteriormente se esterilizó en el autoclave. Una vez que la solución de PDA se enfrió se procedió a verterla en cada una de las placas Petri en las que se cultivó el hongo

5.5.2 Preparación del inocular

Se vertió su contenido (conidias) en un erlenmeyer de 1500 ml, al que se le añadió un litro de agua destilada y 1 ml de tenso-activo, y posteriormente se agitó por 5 min para homogenizar la solución, de éste se tomó un ml para una cámara de Neubauer y se realizó los conteos de esporas en 5 campos de la cámara, y del total obtenido en los dos puntos se promediara el número de esporas/ml (Leite *et al.*, 2003). El objetivo era obtener una concentración de $3,2 \times 10^8$ conidios/ml de la solución.

5.5.3 Preparación del sustrato sólido

En la preparación del sustrato sólido se determinó el material o desecho orgánico a utilizar (Maíz, Arroz, Sorgo, Pulpa de Café, Bagacillo, aserrín), y se adecuó el tamaño de este para que exista una mezcla homogénea de sustrato mismo. Se recomienda que las partículas sean menor a 5mm para que el manejo sea mejor.

5.5.4 La desinfección de sustrato

El primer paso realizado es el lavado con abundante agua esto con el fin de remover los contaminantes no deseados como tierra exceso de polvo del sustrato a utilizado se realizó con vapor de agua durante 20 minutos en el autoclave.

5.5.5 Ajuste de la humedad

El ajuste de la humedad se realizara en un baño maría, se realiza en base al peso del sustrato húmedo, es decir que pesamos el sustrato y luego quitamos aproximadamente un 25% de su peso inicial. Los hacemos con la siguiente formula

$$HA = \frac{PI * \%D}{100}$$

HA= Humedad ajustada

PI= Peso Inicial (Peso Húmedo)

%D= Porcentaje de humedad deseado

5.5.6 Siembra del inóculo en el sustrato

Para la siembra o inoculación del hongo se usara una jeringa estéril para realizar la inyección en la bandeja, según la metodología seguida por Hernández y Carrillo (1997), donde se aplicaron 2 ml/100g de sustrato a una concentración $3, 2 \times 10^8$ conidios/ml. Se debe tener en cuenta que para cada inoculación, la aguja de la jeringa se flameó en el mechero cuidando de enfriarla unos pocos segundos cerca de la llama antes de proceder a la siguiente siembra o inoculación. Todo lo anterior se hace para eliminar los microorganismos contaminantes. Posteriormente el orificio dejado para la inoculación será

sellado utilizando para ello cinta masking tape y, por último se almacenan las bandejas inoculadas en un lugar que no tenga contacto directo con la luz solar

5.6 Diseño experimental

Para las evaluaciones de los diferentes sustratos y su relación con el crecimiento del hongo *Beauveria sp.* Se utilizara un diseño completamente al azar (DCA), contando con 12 medios de cultivo (arros, maíz, sorgo, aserrín, bagazo de caña, pulpa de café; los otros medios de cultivo se realizaran con los mismos sustratos agregándoles melaza como complemento.)

5.7 Fermentado del sustrato

El fermentado del sustrato se realiza durante 10 días que serán en la que se tomaran mediciones del crecimiento, la unidad de medida que pretende utilizar es el $\text{cm}^2/\text{Día}$.

5.8 Variables a evaluar

5.8.1 Medición del grado de colonización del hongo *Beauveria sp.*

Esta medición se realizara estimando mediante papel milimetrado, la cantidad de cm^2 que el hongo coloniza diariamente

5.8.2 Secado del sustrato fermentado

Se vuelca el contenido de sustrato colonizado en bandejas acondicionándolas en una cámara o ambiente con un extractor de aire, aire acondicionado, etc., lo que dependerá de las posibilidades locales. Diariamente se pesa el sustrato colonizado hasta verificar peso constante. El período de secado puede ser variable en función del acondicionamiento del ambiente de secado. Método utilizado por Sivila y Alvarez, 2013

5.8.3 Conteo de conidios por gr de sustrato

Para el conteo de conidios por gramos de sustrato fermentado se realizara en base a la metodología utilizada por Sivila y Alvarez.

Se determina por conteo directo en cámara de Neubauer. Se realizan suspensiones en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y 1gr del sustrato colonizado, se cuenta el número de conidios de los cuatro cuadrados secundarios (CS) esquinados y el central de la cámara (CC), aplicando la siguiente fórmula se obtienen los números de conidios por mililitros. una de 5 CS x 50000= conidios/ml. El número de conidios contados por gramo del producto final se obtiene multiplicando el número de conidios presentes en 1 mililitro por el número de mililitros en que fue disuelta la muestra y dividiendo este resultado entre los gramos de muestra usados.

$$(CM \times B) / G = GM$$

CM= Conidios por mililitro

B= Cantidad de mililitros usados en la solución madre.

G= Cantidad de gramos usados en la solución madre.

GM= Conidios por gramo de muestra

5.8.4 Pruebas de viabilidad

Se evalúa si los conidios están vivos o no. Se trata de una prueba de germinación conidial, mediante la realización de microcultivos en medios nutritivos agarizados o líquidos,- por conteo de viables en placa (ufc/g o ml de producto). Se realizan suspensiones en agua de acuerdo a lo descrito en el conteo de conidios por gramo de sustrato, posteriormente se realiza la siembra en portaobjetos excavados con APG 2%, colocándose en estufa a 25°C. La observación se realiza dentro de las primeras 24 horas. Observando al microscopio óptico se realiza el conteo de conidios germinados, calculando luego el porcentaje de germinación con la siguiente formula% Germinación.

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{Conidios Germinados} \times 100}{\text{Total de CG+NG}}$$

CG= Conidios Germinados

NG= Conidios No Germinados

VI RESULTADOS Y DISCUCION

6.1 Colonización de sustrato por dia

Para esta variable se encontraron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos evaluados, siendo el tratamiento de sorgo precocido más agua 290.06 cm. el de mayor grado de colonización en un menor tiempo, los tratamientos maíz precocido más melaza, maíz precocido más agua y arroz más melaza muestran similitud en cuanto a colonización como se muestra en la figura 1.

Los tratamientos maíz más agua, maíz más melaza, pulpa de café más agua, pulpa de café más melaza, bagazo más agua, bagazo más melaza, aserrín más agua, aserrín más melaza, no mostraron colonización del hongo en el sustrato, los demás tratamientos se mostraron favorables para el crecimiento y colonización del hongo. Se ha señalado que la cantidad de carbono presente en el medio de cultivo, así como la relación carbono: nitrógeno, influye grandemente en diferentes procesos del desarrollo de estos hongos, y que dicha influencia es dependiente del aislamiento fungoso (Gao L, Sun MH, 2007).

El tratamiento de sorgo más el hongo del genero *Beauveria spp* no logro colonizar el grano del sorgo, esto nos indica que la acción mecánica de penetración del hongo no es efectiva ante la dureza de las cuatro capas (Epicarpio, mesocarpio, endocarpio y testa) que cubren el endospermo que es la parte nutritiva del grano.

En cambio al realizar un precocido de unos 45 minutos previo a la inoculación observamos un comportamiento totalmente distinto debido a que la acción física y mecánica que ejerce las altas temperaturas y el exceso de humedad respectivamente, provocan que las cuatro

capas anteriormente mencionadas colapsen, esto crea un condiciones favorable para que el hongo del genero *Beauveria spp.* se desarrolle de manera eficiente

Materias primas carbonadas y nitrogenadas como melaza de caña de azúcar, favorecen el crecimiento del hongo, siendo el objetivo fundamental la obtención de una biomasa homogénea. Mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, se ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias (Ariza y González, 1997).

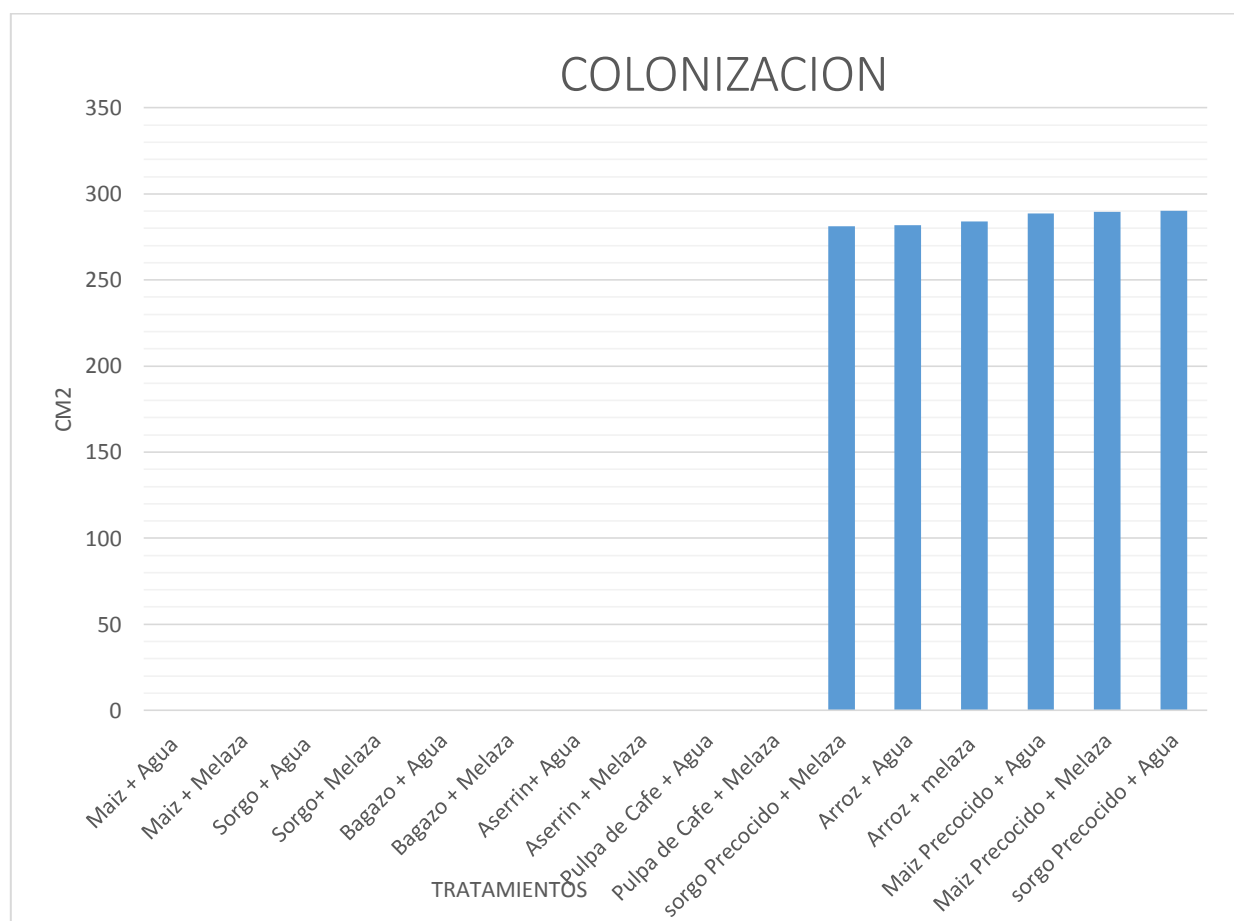


Figura 1 Crecimiento de micelio del hongo (*Beauveria spp.*). Según el sustrato solido evaluado como medio de cultivo

6.2 cantidad de conidios por gramo de sustrato

En la figura 2 muestra los resultados de los tratamientos evaluados, el tratamiento que presento mayor contenido de conidios por gramo de sustrato fue arroz más agua con 7.59×10^{11} conidios/gramo. Seguido de arroz más melaza obtuvo una mejor media en la producción de conidios este efecto probablemente es generado por la limitancia de N que existe entre el arroz, sumándole la melaza que sirve de complemento perfecto y genera las mejores condiciones para la reproducción (Agames *et al* 2008).

Los tratamientos maíz más agua, maíz más melaza, sorgo más agua, sorgo más melaza, bagazo más agua, bagazo más melaza, aserrín más agua, aserrín más melaza, pulpa de café más agua, pulpa de café más melaza no presentaron presencia de conidios, debido a que estos tratamientos no presentaron crecimiento alguno, al no haber presencia de la estructura de crecimiento del hongo esto da como resultado la ausencia de la estructura reproductiva. La germinación, el crecimiento, la esporulación y la virulencia, son características de los hongos que pueden ser afectados por la temperatura, luz ultravioleta y la humedad (Shaner, 1992).

El arroz es el sustrato más usado para la producción masiva de hongos entomopatógenos por mantener las condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva para el crecimiento micelial, un adecuado balance nutricional, y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad.

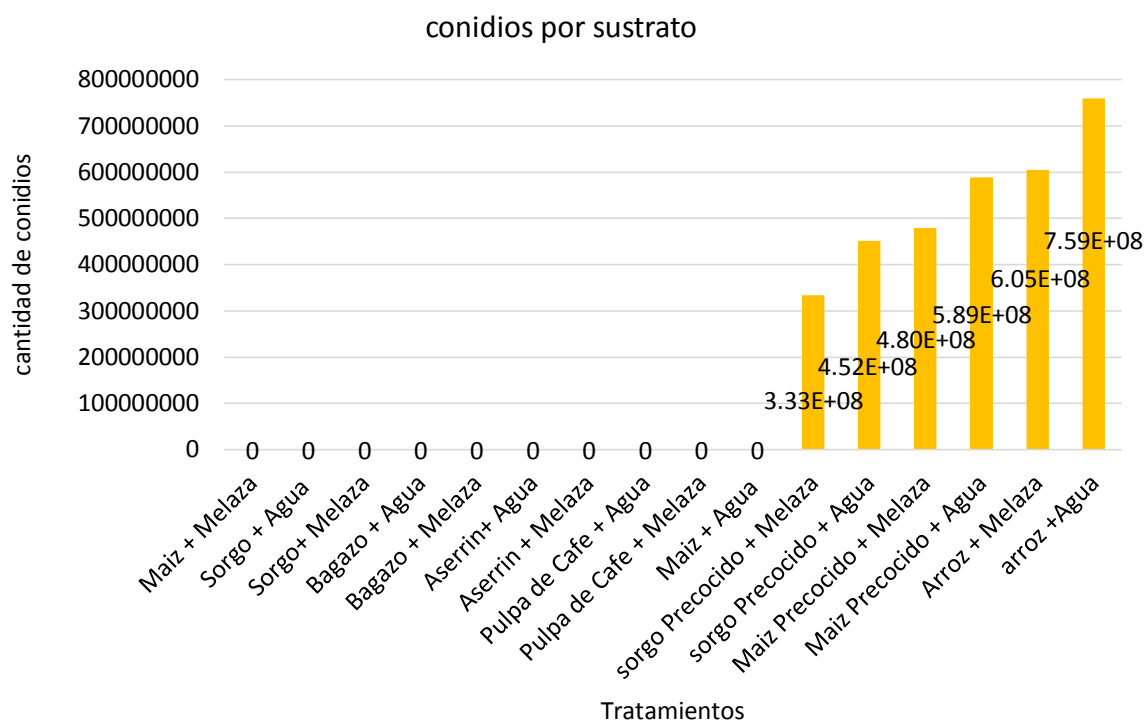


Figura 2 Numero de conidios por gramo de sustrato hongo (*Beauveria spp*). Evaluadas con Sustratos solido evaluado como medio de cultivo

6.3 porcentaje de viabilidad

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tratamientos, los datos obtenidos reflejan que el tratamiento maíz precocido mas melaza con 92.3 %, presentó el valor más alto de viabilidad, Mientras que los tratamientos maíz precocido más agua 91.03% y sorgo precocido mas melaza 90.57% muestran similitud en cuanto a porcentaje de viabilidad, como se observa en la **figura 3**.

Los datos obtenidos reflejan porcentajes de viabilidad, mayores a un 90% con excepción de Sorgo precocido más agua 88.39%, arroz más melaza 78.7%, arroz más agua 72.93%. Debido a que las lecturas se hicieron a las 18 horas después de la micro siembra estos porcentajes de Viabilidad pueden variar a mayor tiempo se realice la lectura.

Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos superan el estándar recomendado según. (Goettel, M. S, 1997). La viabilidad de un producto es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar expresada en porcentaje. El

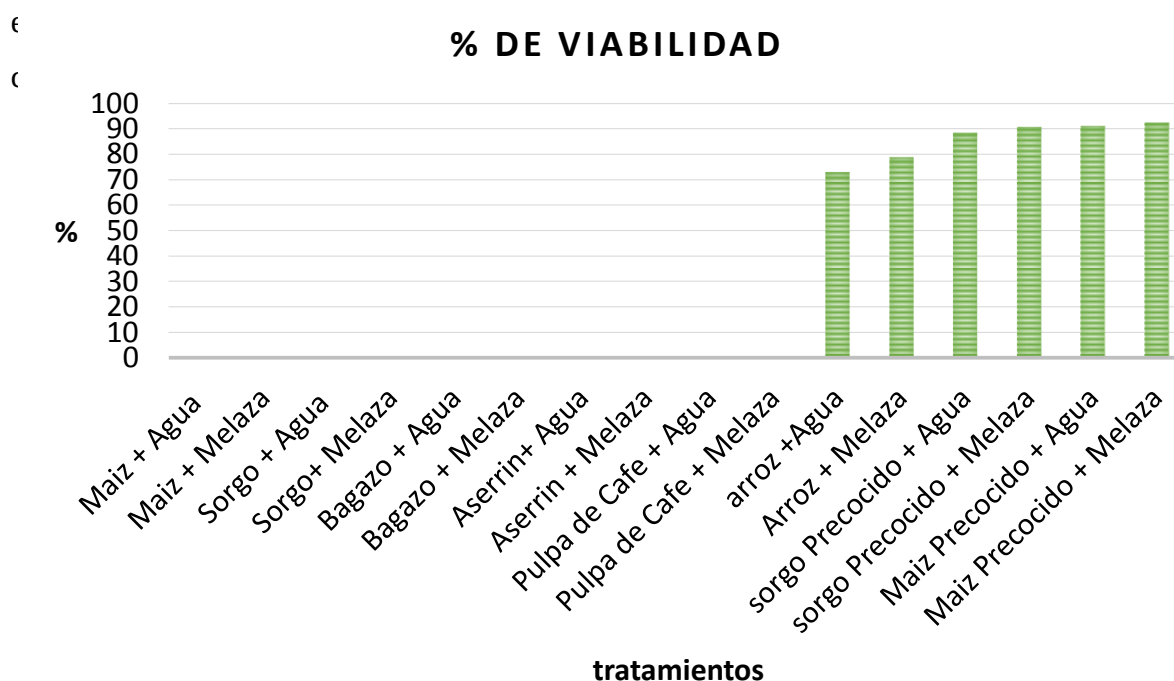


Figura 3 Porcentaje de viabilidad del hongo (*Beauveria spp*). En los diferentes sustratos evaluados

6.4 Porcentaje de Viabilidad en tratamiento de rayos ultravioleta

Los datos obtenidos en la figura 4, reflejan una alta diferencia significativa para los diferentes tratamientos. Cinco tratamientos, 0 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. Expuesto en la cámara de flujo laminar simulando los rayos ultravioleta del sol. El porcentaje de viabilidad de las muestras expuestas a la cámara de flujo laminar simulando los rayos ultravioleta del sol se observa que a mayor tiempo de exposición disminuye la viabilidad de este contrario a las que no tuvieron exposición a la cámara de flujo laminar y fueron dejadas al ambiente presentaron las medias más altas de viabilidad. Los resultados obtenidos concuerdan con (Alves, 1986). La exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidios de los patógenos, resultados similares obtenidos Steinhilber (1949) citado por Nirula (1957) quienes observaron que el crecimiento y esporulación de los hongos es retrasado por la radiación solar y que la nubosidad tiene un papel importante en el desarrollo de las epizootias causadas por hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos son muy susceptibles a la inactivación por la radiación ultravioleta del espectro solar. Las conidias de los hongos como los de la mayoría de microorganismos pierden rápidamente su viabilidad al ser expuestos al sol que es una de las principales fuentes de luz ultravioleta. La tendencia descendente que genera el grafico, nos muestra un evidente comportamiento inversamente proporcional entre el tiempo y porcentaje de viabilidad, similar a la teoría de Alfonso 2004 quien indica que a mayor tiempo de exposición a radiación UVC el porcentaje de viabilidad se ve reducido

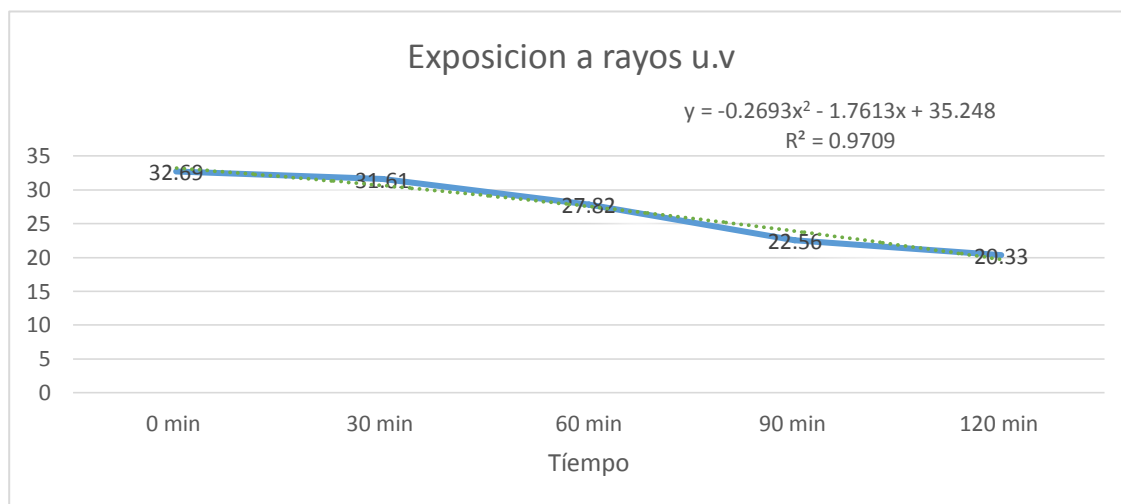


Figura 4. Evaluación del porcentaje de viabilidad del hongo a exposición de rayos ultravioleta en seis diferentes sustratos sólidos y melaza como complemento.

CONCLUSIONES

Sorgo precocido más agua es el tratamiento en que el hongo *Beauveria Spp.* Presenta mejor nivel de crecimiento y colonización Con una media de 290.06 cm² de colonización

La utilización de la melaza como complemento en la producción artesanal de *beauveria spp.* Presenta una buena alternativa ya que combinado con algunos sustratos es responsable De generar una mayor cantidad de conidios por gramo de sustrato, al igual que combinado con el maíz precocido presento una mayor viabilidad

El tratamiento de maíz precocido mas melaza presento un porcentaje mayor de viabilidad sobre los demás tratamientos con un 92.3%

El género *beauveria spp.* En la producción en sustrato sólido, presenta una mayor producción de conidios en el tratamiento de arroz más agua con una concentración de 7.59×10^8 conidios /gramo de sustrato.

Existe una correlación entre el sustrato utilizado y la viabilidad de los conidios

Hay que tomar en cuenta que la melaza al combinarlo con algunos sustratos nos genera mejores resultados como la viabilidad, también que al precocer algunos sustratos nos da mejores resultados ya que se facilita que el género *beauveria spp.* Se pueda reproducir mejor.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la combinación de melaza y sustrato resultó ser un medio sólido adecuado para la producción de biomasa del hongo, mientras que el maíz entero, mediante un proceso de precocido en agua, resultó muy efectivo para la producción de conidios del hongo, por lo que ambas alternativas deben continuar evaluándose para su posible introducción en un programa de producción masiva de dicho hongo mediante el método artesanal

Efectuar estudios del hongo entomopatógenos en esta investigación en otros tipos de sustrato con diferentes complementos.

Realizar una metodología para la producción masiva de hongos para cada sustrato para tener un mayor control y manejo.

Hacer un estudio sobre las pruebas de viabilidad del hongo (*Beauveria spp.*) Después de 20 horas

Realizar ensayos con los diferentes sustratos y hacer una metodología específica para cada uno en lo que respecta a esterilización manejo y control en la producción masiva de hongos

La selección del sustrato depende de un número de factores, incluyendo la disponibilidad local, los costos, y la preferencia del hongo a cultivar. Utilizar los sustratos como el arroz, maíz precocido y sorgo precocido que son los que mejor resultado dieron en el experimento realizado, son baratos y están disponibles en la localidad

Efectuar estudios sobre la cantidad de luz y oscuridad a la que se debe exponer el hongo para tener una esporulación más eficiente.

VII BIBLIOGRAFIAS

Barron, G. 2001. George Barron`s Website on Fungi. Universidad de Guelph, Ontario, Canada. Consultado 4 de junio de 2014. Disponible en:
<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>

Duperchy, E. 2003. Identification of up-regulated genes of the hyphomycete *Beauveria bassiana* , during the infection of *Leptinoptarsa dicemlineata* . Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 111 p.

EDAFON. 2005. Fundación Agroecológica. Consultado. 4 de junio de 2014 Disponible en:
<http://www.controlbiologico.com/bassianil.htm>

Feng, M. G.; Poprawski, T. J., G. G. 1994. Production formulation application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control worldwide. *Biocontrol Sciences and Technology* 4: 3-34.

Jegorov A, Sedmera P, Matha V, Simek, P, Zahradnickova H, Landa, Eyal J (1994)
Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*
Phytochemistry 37: 1301-1303

Jorge Zabulón Matute, 2013, hongos endofíticos como indicadores de promoción de crecimiento en cultivos agrícolas, Olancho Honduras. pp 18

Porter, J.R. (1973). Agostino Bassi bicentennial (1773-1973). *Bacteriological Reviews* 37, 284-288.

Kanaoka M, Isogai S, Murakoshi M, Ichinoe M, Suzuki A, Tamura S, (1978)
Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* *Agric. Biol. Chem.* 42: 629-635.

Kouassi, M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana* . Universidad de Québec, Montreal, Canada. VertigO. La revista en ciencias ambientales de la web. 2 (2). Consultado 4 junio de 2014. Disponible en: www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html

Madrigal, A. 2001. Fundamentos de control biológico de plagas. Medellín: Editorial Universidad Nacional de Colombia. 453 p.

Quesada-Moraga, E; Navas-Cortés, J A; Maranhao, E A; Ortiz-Urquiza, A y Santiago-Alvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111: 947 – 966.

Samson, R.A., Evans, H.C., and Lateg, J.P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Sringer Verlag, Berlin, 225 p.

Tanada, Y.; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666p.

Vuillemin, P. (1912). Beauveria, nouveau genre de Verticilliacies. Bulletin de la Société Botanique de France 59,34–40.

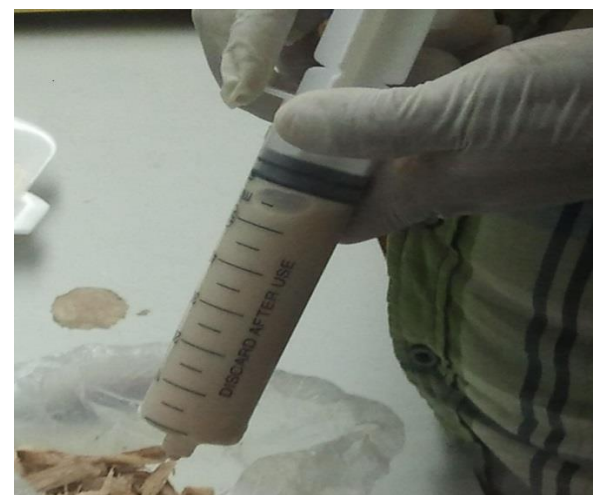
Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* : Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 147 p.

VIII ANEXOS

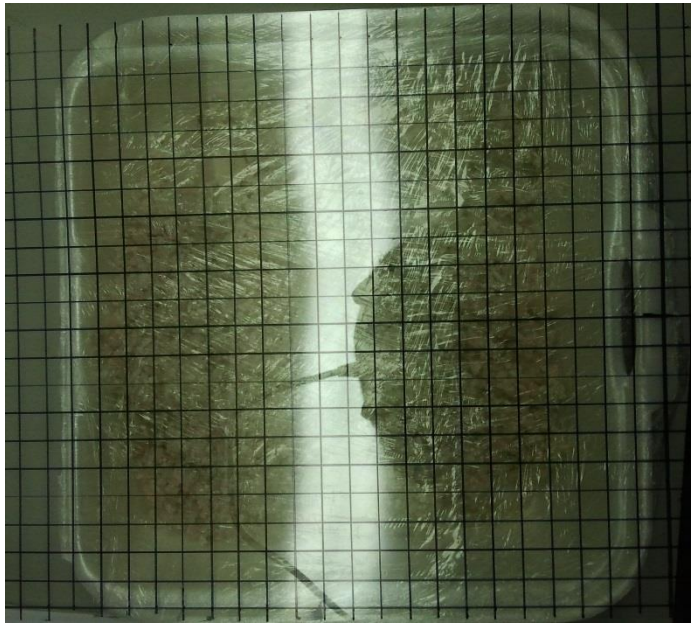
Anexo 1 Preparación y esterilización del sustrato



Anexo 2 Preparación del inoculo.



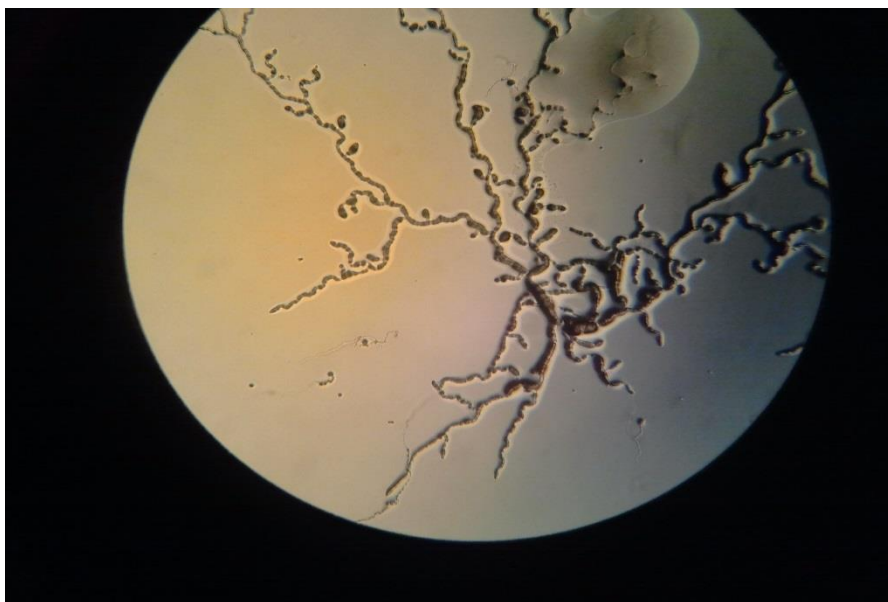
Anexo 3 Medición de crecimiento de micelio



Anexo 4 Preparación de las disoluciones



Anexo 5 Conteo de conidios para calcular el porcentaje de viabilidad



Anexo 6 Análisis de Varianza para la variable Crecimiento de micelio

pruebas de los efectos inter-sujetos

variable dependiente: crecimiento

fuelle	suma decuadrados tipo III	GL	media cuadratica	F	significacion
repeticion	2625.532	2	1312.766	3.994	0.019
tratamiento	15637269.1	15	1042484.6	3171.5	0.000
Rep*Trat	11455.566	30	381.852	1.162	0.256
días	1061066.074	16	66316,630	201.75	0.000
trat*días	1812108,985	240	7550454	22.97	0.000
error	168296.235	512	328.704		
total corregida	18692821.5	815			

a R cuadrado = 0,991 (R cuadrado corregida = 0,986)

crecimiento

DHS de Tukey

Sustratos	N	subconjunto	
		1	2
maiz	51	0.00	
maiz-melaza	51	0.00	
Sorgo	51	0.00	
sorgo-melaza	51	0.00	
Bagazo	51	0.00	
bagzo-melaza	51	0.00	
Aserrín	51	0.00	
aserri-melaza	51	0.00	
pulpa de café	51	0.00	
pulpa de café-melaza	51	0.00	
sorgo precocido-melaza	51		281.10
Arroz	51		281.88
arroz-melaza	51		284.10
maiz precocido	51		288.63
maiz precocido-melaza	51		289.67
sorgo precocido-melaza	51		290.06
Significación		1.000	0.476

se muestran las medias para los grupos en subconjuntos

Homogéneos

basados en la suma de cuadrados tipo III

a. usa el tamaño muestral de la media armonica= 51.000

b. Alfa = 0.05

Anexo 7 Análisis de Varianza para la variable Número de conidios/gr de Sustrato

prueba de efectos inter-sujecos

variable dependiente:conidios

fuelle	suma de cuadrados tipo III	gl	media cuadratica	F	significacion
repeticion	1.366E+18	2	6.8E+17	0.395	0.674
tratamiento	5.463E+19	15	3.6E+18	2.105	0.008
error	1.380E+21	798	1.7E+18		
total corregido	1.436E+21	815			

a. R cuadrado= 0.059(R cuadrado Corregido = 0.39)

conidios

DHS de Tukey

Sustratos	N	subconjunto
		1
maiz-melaza	54	8.50
Sorgo	54	8.50
sorgo-melaza	54	8.50
Bagazo	54	8.50
bagazo-melaza	54	8.50
Aserrín	54	8.50
aserrin-melaza	54	8.50
pulpa de café	54	8.50
pulpa de café-melaza	54	8.50
Maíz	40	8.85
sorgo precocido-melaza	54	333333342
sorgo precocido	54	451851860
maiz precocido-melaza	54	479629638
maiz precocido	54	568518527
arroz-melaza	37	605405414
Arroz	37	759459468
Significación		1.000

se muestran las medias para los grupos en subconjuntos

Homogéneos

basado con la suma de cuadrados tipo III

a. usa el tamaño muestral de la media armonica=50.032

b. los tamaños de los grupos son distintos

Alfa= 0.05

Porcentaje de viabilidad

DHS de Tukey^{a,b}

Tiempo de medición	N	Subconjunto
		1
30 min	48	31,61
60 min	48	31,83
0 min	48	32,29
90 min	48	32,35
120 min	48	32,51
Significación		,378

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,101.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 48,000
- Alfa = ,05.

Porcentaje de viabilidad

DHS de Tukey^{a,b}

Tiempo de medición	N	Subconjunto
		1
30 min	48	31,61
60 min	48	31,83
0 min	48	32,29
90 min	48	32,35
120 min	48	32,51
Significación		,378

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,101.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 48,000
- Alfa = ,05.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Porcentaje de viabilidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	420079,056 ^a	111	3784,496	620,262	,000
Intersección rep	247607,298	1	247607,298	40581,710	,000
trat	26,483	2	13,242	2,170	,118
rep * trat	417401,408	15	27826,761	4560,680	,000
tiempo	1279,798	30	42,660	6,992	,000
trat * tiempo	28,194	4	7,049	1,155	,334
Error	1343,173	60	22,386	3,669	,000
Total	780,986	128	6,101		
Total corregida	668467,340	240			
	420860,041	239			

a. R cuadrado = ,998 (R cuadrado corregida = ,997)