

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON

A. Méndez*, E. del Pozo*, Irma García*, A. González**

*Departamento de Biología-Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: amaury@isch.edu.cu; ** Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana, Campus Tuxpan

RESUMEN: En esta investigación se utilizó el aislamiento Nr-003 del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, conservado en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana, con el objetivo de evaluar la producción de conidios en diferentes sustratos sólidos, así como determinar el momento óptimo de cosecha. Para la producción de conidios se utilizaron los sustratos sólidos siguientes: arroz entero, trigo y maíz partido, con una cantidad de 100 g de sustrato en bolsas de polipropileno, inoculados con 35 mL de biomasa, obtenida en un medio líquido a base de melaza (20 mL.L⁻¹) y extracto de levadura (20 g.L⁻¹). A los 18 días se evaluó la producción de conidios.g⁻¹de sustrato, g de polvo conidial.kg de sustrato⁻¹ y conidios.g de polvo conidial⁻¹. Por otro lado se realizó la dinámica de producción de conidios sobre arroz, a partir de los 6 días hasta los 18 días, constituyendo cada momento de evaluación un tratamiento. El hongo produjo conidios en todos los sustratos sólidos, destacándose el arroz entero por su mayor producción (8,93 x 10⁹ conidios.g de sustrato⁻¹, 27,10 g de polvo conidial.kg de sustrato⁻¹ y 2,7 x 10¹¹ conidios.g de polvo conidial⁻¹). El tiempo óptimo de cosecha de conidios fue a los 14 días, momento donde el hongo alcanza la mayor producción conidial.

(Palabras clave: *Nomuraea rileyi*; producción conidial; dinámica de esporulación)

EVALUATION OF SOLID SUBSTRATES FOR MASS PRODUCTION OF *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON

ABSTRACT: The isolate Nr-003 of the entomopathogen fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson from the Crop Protection Laboratory of the Agronomy Faculty, Agrarian University of Havana, was used in this research with the objective of producing conidia on different solid substrates, as well as determining the optimum harvest time on the substrate with the higher conidial production. The solid substrates used for the conidial production were whole rice, wheat and broken corn. Propylene bags with 100 g of each substrate were inoculated with 35 mL of biomass obtained in a liquid media containing molasses (20 mL.L⁻¹) and yeast extract (20 g.L⁻¹). The production of conidia.g of substrate⁻¹, g of conidial powder.kg of substrate⁻¹ and conidia.g conidial powder⁻¹ were evaluated after 18 days. In addition, the dynamics of conidia production on whole rice was evaluated from day 6 to day 18, considering each evaluation time a treatment. The fungus produced conidia on all the solid substrates standing out the whole rice for its highest production (8,93 x 10⁹ conidia.g of substrate⁻¹, 27,10 g of conidial powder.kg of substrate⁻¹ and 2,7 x 10¹¹ conidia.g of conidial powder⁻¹). The optimum time for harvesting conidia was on day 14, when the fungus reached the highest production of conidia.

(Key words: *Nomuraea rileyi*; conidia production; sporulation dynamics)

INTRODUCCIÓN

La insectoresistencia, resurgencia de plagas y problemas de contaminación ambiental y humana han ido en aumento, por lo que se realizan frecuentemente estudios encaminados a la búsqueda de alternativas al control químico de insectos nocivos. Entre ellas se destaca el control biológico, a través de la utilización de enemigos naturales como depredadores, parasitoides, virus y entomopatógenos (1). A nivel mundial el uso de hongos entomopatógenos en las últimas décadas ha ido en ascenso, siendo una de las alternativas más usadas en el control de plagas (2).

El hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson ha sido informado como patógeno de más de 30 especies de larvas de lepidópteros, principalmente cuando estas se encuentran en condiciones de tiempo húmedo (3). Este hongo se ha aislado, fundamentalmente, a partir de insectos muertos y de suelos cultivados (4), encontrándose muy asociado a fitófagos importantes, como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), en campos de maíz (5).

Aunque se reconoce la potencialidad del hongo como agente de control biológico, aún no ha sido ampliamente utilizado como micoinsecticida (2). En los últimos años se han logrado avances en su reproducción masiva, pero aún es necesario continuar trabajando en esa dirección (6,7,8,9).

La mayoría de las especies de hongos son producidas en medios sólidos, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas. Sustratos naturales como el arroz o el salvado de trigo constituyen medios de cultivo adecuados para ese propósito (8,9). Por otro lado, la producción de hongos en sustratos sólidos dificulta la automatización del proceso y carece de una economía, en la producción de conidios, a escala satisfactoria (10).

Este problema puede ser parcialmente resuelto por un proceso de producción en dos fases (cultivo bifásico), en el que los cultivos sumergidos son utilizado para producir una gran cantidad de micelio, el cual es colocado después sobre un sustrato sólido para obtener los conidios necesarios (10,11). El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar diferentes sustratos sólidos, para la producción de conidios de *N. rileyi*, así como determinar el momento óptimo de cosecha del sustrato de mejor respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de conidios de *N. rileyi* en diferentes sustratos sólidos

En la producción de conidios del hongo entomopatógeno *N. rileyi* se utilizaron tres sustratos sólidos: arroz entero, trigo y maíz partido. Cada uno de estos medios se lavaron por separado tres veces con agua común para eliminar la mayor cantidad posible de partículas ajenas a estos. Posteriormente se vertieron por separado en un recipiente que contenía agua en ebullición, donde se mantuvieron por 5 minutos.

Después de precocidos, los sustratos se dejaron enfriar en una bandeja, ya fríos se colocaron 100 g de cada uno en bolsas de polipropileno, las cuales se sellaron y esterilizadas en autoclave, a 121°C por 20 minutos.

Las bolsas se inocularon con 35 mL de biomasa de *N. rileyi* obtenido en un medio líquido a base de melaza (20 mL.L⁻¹) y extracto de levadura (20 g.L⁻¹), después de tres días en agitación continua sobre una zaranda a 120 golpes.min⁻¹ y mantenido a una temperatura de 25 °C. Este medio líquido, con pH 6,38, se inoculó con una suspensión conidial de 4,12 x 10⁷ conidios.mL⁻¹

Después de inoculadas las bolsas se incubaron por 18 días a una temperatura de 25,0±2,0°C. Transcurrido este tiempo, los sustratos con el hongo esporulado se secaron con el empleo de aire acondicionado (18°C) y un deshumificador hasta un contenido de humedad del 15%. Los ensayos se montaron según un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados se expresaron en: conidios.g de sustrato⁻¹, polvo conidial.kg de sustrato⁻¹ y conidios.g⁻¹ de polvo conidial.

Para determinar la producción de conidios.g⁻¹ de sustrato, se extrajo un gramo de sustrato y se colocó en un tubo de ensayo, el cual se enrazó con 10 mL de agua destilada más Agral® a una concentración de 0,05%, y se agitó en un Vortex durante 1 min para separar los conidios del medio. El conteo de conidios se realizó en una cámara de Neubauer. Los datos obtenidos fueron transformados a su logaritmo (Log₁₀ X).

Para la obtención de polvo conidial.kg⁻¹ de sustrato se colocó un kg de sustrato con el hongo esporulado en un vibrador sobre un juego de tamices con orificios que iban desde 1 mm hasta 0,1 mm de diámetro. El polvo conidial cosechado se pesó en una balanza analítica digital.

En la determinación de conidios.g⁻¹ de polvo conidial, se extrajo gramo de polvo conidial y se colocó en un erlenmeyer, el cual se enrazó a un litro con agua destilada más Agral® a una concentración de 0,05%. El conteo de conidios se realizó con la cámara de Neubauer. Los datos obtenidos fueron transformados a su logaritmo (Log₁₀ X).

Los valores obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple. Para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Tukey con un nivel de significación de 0,05%.

Dinámica de producción de conidios de *N. rileyi* (Nr-003) en sustrato arroz

El montaje, inoculación, incubación y evaluación, así como el análisis estadístico, fue similar al ensayo anterior donde se determinó la cantidad de conidios.g⁻¹ de sustrato; excepto que las evaluaciones comenzaron a partir de los 6 días con un intervalo de 2 días hasta los 18 días. Para la realización del análisis estadístico se consideraron como tratamientos los diferentes momentos de evaluación, cada uno con tres réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de conidios de *N. rileyi* en diferentes sustratos sólidos

Al analizar la producción de conidios de *N. rileyi* en diferentes sustratos sólidos, se observaron de forma general diferencias significativas entre los tratamientos. Como puede observarse en la Tabla 1, el hongo produjo conidios en todas las variantes, destacándose significativamente el tratamiento constituido a base de arroz donde se obtuvieron valores de 8,93 x 10⁹ conidios.g⁻¹ de sustrato, 27,10 g de polvo conidial.kg⁻¹ de sustrato y 2,7 x 10¹¹ conidios.g⁻¹ de polvo conidial. Por otro lado los tratamientos a base de maíz partido y trigo difieren entre sí,

alcanzándose los menores valores de producción de conidios en el sustrato trigo.

Los hongos entomopatógenos desarrollados sobre arroz en bolsas plásticas bajo un sistema de producción artesanal han alcanzado rendimientos del orden de 10¹⁰ conidios.g⁻¹ de sustrato, aunque lo más frecuente, en la mayoría de las especies, son los valores de 10⁹ conidios.g⁻¹ de sustrato (11,12).

El arroz es el sustrato más utilizado 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 cuanto a aireación y contenido de humedad (12,13).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que estos medios fueron precocidos, donde los valores de humedad alcanzados en el sustrato arroz antes de inocular las bolsas con la biomasa producida en el medio líquido alcanzan hasta un 34,96% (14). El contenido de humedad del sustrato sólido es un parámetro determinante en el rendimiento de conidios de los hongos mitospóricos, debiendo estar entre un 35 y un 60%, este efecto se debe, fundamentalmente, a la relación que existe entre dicho contenido de humedad y la disponibilidad de oxígeno, elemento este que es indispensable en el caso de la esporulación de *N. rileyi* (13,14).

Dinámica de producción de conidios de *N. rileyi* (Nr-003) en el sustrato arroz

El análisis estadístico realizado, en cada uno de los momentos de evaluación mostró diferencias significativas. En la Figura 1 se observa la producción de conidios.g⁻¹ de sustrato con relación al tiempo.

A los seis días ya se observa que hay producción de conidios sobre el sustrato, comenzando la fase exponencial de crecimiento a los ocho y terminando a los 12 días. A los 14 días inicia la fase de meseta

TABLA 1. Producción de conidios en diferentes sustratos sólidos./ *Conidia production on different solid substrates*

Sustratos	Conidios.g sustrato ⁻¹		g de polvo conidial.kg de sustrato ⁻¹	Conidios.g de polvo conidial ⁻¹	
	X orig.	X Transf.		X orig.	X transf.
Arroz	8,93 x 10 ⁹	9,95 a	27,10 a	2,70 x 10 ¹¹	11,42 a
Maíz	1,14x 10 ⁹	9,04 b	15,68 b	3,91 x 10 ¹⁰	10,59 b
Trigo	5,87 x 10 ⁸	8,77 c	11,35 c	1,77 x 10 ¹⁰	10,24 c
CV (%)		0,8658*	6,1959*		1,0018*
Ex		0,1129	1,6397		0,1512

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Tukey (p≤0,05).

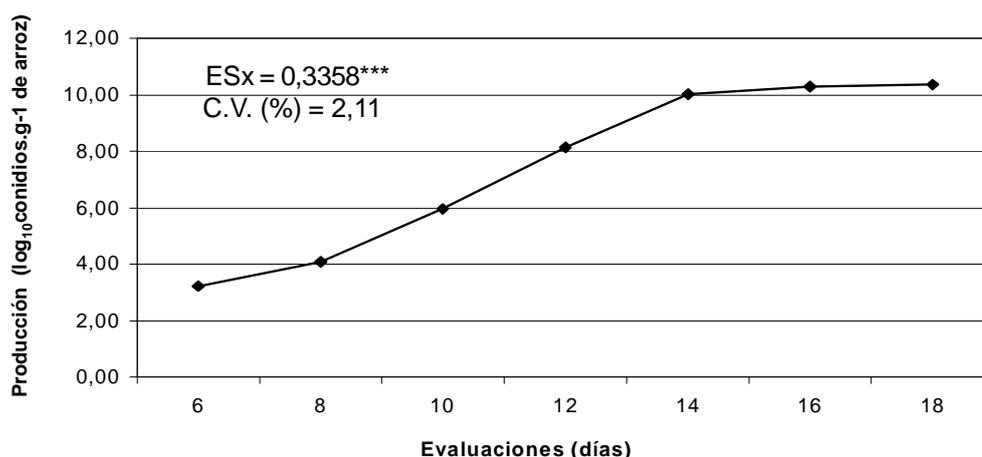


FIGURA 1. Dinámica de producción de conidios en arroz entero./ *Conidia production dynamics on whole rice.*

donde se estabiliza la producción de conidios, alcanzándose los valores mayores de $8,58 \times 10^9$; $8,86 \times 10^9$ y $8,93 \times 10^9$ conidios.g⁻¹ de arroz en las evaluaciones a los 14, 16 y 18 días, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellas.

Estos resultados permiten establecer como momento óptimo los 14 días para iniciar el proceso de cosecha, tiempo menor en que se alcanza la mayor producción de conidios sobre el sustrato arroz. Este tiempo de cosecha, para este y otros hongos, se ha utilizado en trabajos realizados por varios autores (14,15), ya que al inicio de la fase de meseta, la producción de conidios se mantiene constante con relación al tiempo.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el arroz entero fue el sustrato más adecuado para la producción de conidios del hongo entomopatógeno *N. rileyi*; mientras que el momento óptimo de cosecha de este hongo sobre el sustrato fue a los 14 días.

REFERENCIAS

1. Santoro P, de Oliveira P, Zani R, Akimi S, Zorzetti J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num proceso bifásico utilizando diferentes meios líquidos. *Ciências Agrárias*. 2005; 26(3):313-320.
2. Faria M, Wraight SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 2007; 43:237-256.
3. Devi U, Mohan C, Padmavathi J, Ramesh K. Susceptibility to Fungi of Cotton Bollworms before and after a natural epizootic of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Biocontrol Sci Technol*. 2003; 3(3):367-371.
4. Bing S, Yu H, Chen A, Liu X. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*. 2008; 27:1421-1426.
5. Wyckhuys KA, O'Neil RJ. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. *Crop Protection*. 2006; 25:1180-1190.
6. Ramegowda GK, Lingappa S, Patil RK. Production of aerial conidia of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson on liquid media. *J Entomol Res*. 2007; 31(3):312-318.
7. Devi PS, Chowdary A, Prasad YG. Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson. *Mycopathologia*. 2001; 151(1):35-39.
8. García I, del Pozo E, Méndez A, Céspedes Y. Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento Nr-003, en diferentes medios de cultivos líquidos, con agitación. *Rev Protección Veg*. 2006; 21(3):173-177.

9. Mongkolwai T, Vatanabot U, Prompibon P, Bnayat C, Wiwat C, Bhurniratana A. Production of *Nomuraea rileyi* by solid substrate and submerged fermentations. (En línea). Disponible en: <http://www.aseanbiotechnology.info/abstract/23003644.pdf>. 2008. (Consultado: 31 mar 2008)
10. Wraight S, Jackson M, Kock S. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial*. CAB International. 2001.
11. Jenkins NE, Heviefó G, Langewald J, Cherry A, Lomer CJ. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 1998; 19(1):21-31.
12. Bhanu Prakash GVS, Padmaja V, Siva Kiran RR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. *Bioresource Technology*. 2008; 99(6):1530-1537.
13. Sahayaraj K, Karthick S. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. *Afr J Biotechnol*. 2008;7(12):1907-1910.
14. Méndez A, del Pozo E, García I. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Rev Protección Veg*. 2009; 24(3):156-161.
15. Cherry AJ, Jenkins NE, Heviefó G, Bateman R, Lomer CJ. Operational and Economic Analysis of a West African Pilot-scale Production Plant for Aerial Conidia of *Metarhizium* spp. for Use as a Mycoinsecticide Against Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Sci Technol*. 1999; 9:35-51.

(Recibido 28-3-2010; Aceptado 15-6-2010)