

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DEL AISLAMIENTO (Nr-003) DE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS CON AGITACIÓN Y SU VIRULENCIA SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

A. Méndez, E. del Pozo e Irma García

Departamento de 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

RESUMEN: Con el propósito de determinar la producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson se evaluó el efecto de cuatro medios de cultivos líquidos en agitación: caldo de boniato (B), boniato-extracto de levadura (BL), boniato- extracto de levadura-cloruro de calcio (BLC) y boniato-cloruro de calcio (BC). Se realizó también la dinámica de producción de biomasa sobre un sustrato de melaza- extracto de levadura. Se evaluó, además, la virulencia del aislamiento Nr-003 sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), determinándose las relaciones dosis-mortalidad, con los datos de los 7 días y tiempo-mortalidad, para la mayor de las dosis utilizadas, a través de un análisis de Probitas, calculándose los valores de dosis letal media (DL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}). El hongo creció bien en los cuatros medios utilizados aunque los mejores resultados se obtuvieron con el BL. En cuanto a la dinámica de crecimiento se determinó que este hongo forma masa seca a partir de las 12 horas, experimentando un rápido crecimiento a las 60 horas, siendo este más lento cuando adquiere el tiempo de 108 horas. Con relación a la prueba de virulencia se aprecia que la DL_{50} a las 168 horas es de 9.7×10^5 conidios.mL⁻¹ y la TL_{50} para la mayor de las dosis utilizadas es de 111.5 horas.

(Palabras clave: *Nomuraea rileyi*; *Spodoptera frugiperda*; medio líquido; virulencia)

BIOMASS PRODUCTION BY THE STRAIN Nr-003 OF *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON IN DIFFERENT LIQUID MEDIA IN SHAKE CULTURE AND ITS VIRULENCE ON *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

ABSTRACT: With the purpose of determining the biomass production by the strain Nr-003 of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson and its virulence on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), the effect of four liquid media was evaluated in shake culture. They were sweet potato broth (B), sweet potato broth – yeast extract (BL), sweet potato broth-yeast extract-calcium chloride (BLC) and sweet potato broth-calcium chloride (BC). The biomass production dynamics on a molasses-yeast extract substrate was also studied. The virulence of the strain was assayed on *S. frugiperda* larva determining the relationships dose - mortality with the data of the seven days, and time – mortality for the highest of the doses used through a Probit analysis calculating the values of the lethal dose (LD_{50}) and the lethal time (LT_{50}). A good fungus growth was obtained on the four culture media with the best results on BL. Regarding the growth dynamics, it was found that this fungus produced dry mass after the first 12 hours with a fast growth after 60 hours that became slower after 108 hours. The virulence test showed that the DL_{50} at 168 hours was 9.7×10^5 (conidia. mL⁻¹) and the TL_{50} for the highest dose used was 111.5 hours (4.6 days).

(Key words: *Nomuraea rileyi*; *Spodoptera frugiperda*; liquid medium; virulence)

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, es evidente que la agricultura convencional a nivel mundial está en crisis, muchos investigadores e intelectuales han estudiado esta problemática y se ha sugerido la necesidad de una transición de la agricultura moderna hacia una agricultura sostenible, en la cual el control biológico sería una eficiente alternativa para el control de plagas, sin comprometer el medio ambiente (5).

El desarrollo de medios biológicos para el control de insectos nocivos lleva implícito la búsqueda de patógenos eficaces, mediante los cuales se puedan obtener biopreparados masivamente e ir sustituyendo gradualmente las aplicaciones químicas sobre la base de la efectividad de los medios biológicos aplicados (3).

En la agricultura, los hongos entomopatógenos representan una alternativa muy promisoría en el control de plagas (23), siendo, en su mayoría, totalmente inocuos al medio ambiente, el hombre y los animales (1). Debido a la potencialidad en el control de insecto dañinos a los cultivos, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson ha sido señalado como un eficaz agente de control biológico, fundamentalmente contra larvas de lepidópteros, ejerciendo su mejor acción en condiciones de tiempo húmedo (20).

Para la producción masiva de estos agentes de control biológico es necesario el estudio de nuevos sustratos que sean más eficientes y menos costosos (4, 16). También es de gran importancia trabajar con aislamientos que expresen una alta virulencia para crear fuertes epizootias en el campo, lo que puede resultar de interés a la hora de su utilización en programas de manejo de plagas (16).

El objetivo de este trabajo es evaluar la producción de masa seca del aislamiento (Nr-003) del hongo entomopatógeno *N. rileyi* en diferentes medios de cultivos líquidos con agitación, así como evaluar su virulencia sobre larvas de *S. frugiperda*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* utilizado en los ensayos, se obtuvo a partir de larvas micosadas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), colectadas en campos de maíz (*Zea mays* L.) establecidos en el municipio Quivicán, provincia La Habana. El aislamiento es conservado en el cepario del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana.

Producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo con agitación

Los medios de cultivos empleados fueron: caldo de boniato (B) a razón de 50 g. L⁻¹, boniato- extracto de levadura (BL) a 50 y 10 g. L⁻¹ respectivamente, boniato- extracto de levadura-cloruro de calcio (BCL) a 50-5-2.5 g. L⁻¹ y boniato-cloruro de calcio (BC) a concentraciones de 50-2.5 g. L⁻¹ de cada elemento empleado.

Se utilizaron frascos erlenmeyer de 250 mL a los cuales se le añadió 50 mL de medio de cultivo, se taparon con tapones de algodón y gasa y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Después de enfriado, cada frasco se inoculó con una jeringuilla automática que contenía 3 mL de una suspensión de esporas con una concentración de 10⁸ conidios.mL⁻¹, preparado con agua destilada – estéril y Tween 80 a una concentración de 0.05%; posteriormente los frascos se colocaron en una zaranda a 120 golpes / min a una temperatura de 25 ± 2°C. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamientos. Se evaluó a los siete y nueve días, transcurrido este tiempo, el contenido de los frascos se filtró al vacío y la biomasa obtenida se colocó en una estufa durante 24 h a una temperatura de 80°C con el objetivo de obtener los valores de masa seca, la cual se expresó en g.L⁻¹. Los resultados obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple para cada momento de evaluación. Para la comparación entre las medias se utilizó la Dócima de Rango Múltiple de Duncan.

Dinámica de producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi*

El procedimiento para el montaje, incubación y evaluación fue similar al descrito en el ensayo anterior, excepto que el sustrato utilizado fue melaza (25 mL) y levadura (10 g) para un litro de agua destilada estéril. Las evaluaciones comenzaron a partir de las 12 h hasta 120 h con intervalo de 24 h. Para la realización del análisis estadístico se consideraron como tratamientos los diferentes momentos de evaluación.

Virulencia del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*

Para este ensayo se colectaron larvas del tercer instar de *S. frugiperda* en campos de maíz que no habían recibido tratamientos biológicos ni químicos. Las diferentes concentraciones de *N. rileyi* se prepararon con agua destilada y se ajustaron como una sucesión geométrica de progresión 10 a partir de una suspensión inicial obtenida de un cultivo puro con-

servado sobre un medio constituido por extracto de malta agar y extracto de levadura. Las concentraciones de conidios se determinaron mediante el hematocímetro de Neubauer, las cuales fueron:

- $D_1 = 4.25 \times 10^7$ conidios. mL^{-1}
- $D_2 = 4.25 \times 10^6$ conidios. mL^{-1}
- $D_3 = 4.25 \times 10^5$ conidios. mL^{-1}
- $D_4 = 4.25 \times 10^4$ conidios. mL^{-1}

Para la inoculación de las larvas se le adicionó sobre el cuerpo dos gotas de la suspensión conidial. Posteriormente se colocaron individualmente en placas Petri que contenían suficiente alimento, el cual se cambió diariamente.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones, 10 larvas en cada una, para un total de 30 insectos por tratamiento. Como testigo se utilizaron larvas inoculadas con agua estéril.

Se realizaron observaciones diarias hasta que empezaron a aparecer larvas muertas. A partir de ese momento se contabilizó el número acumulado de las mismas, para determinar el porcentaje de mortalidad a los 4, 5 y 7 días. Los resultados obtenidos fueron transformados según la expresión $\arcsen(p+5)^{1/2}$ y procesados mediante un análisis de varianza simple para cada momento de evaluación. Las medias fueron comparadas utilizando la Dócima de Rango Múltiple de Duncan.

Se determinó la relación dosis-mortalidad, con los datos de las 168 horas (7 días) y tiempo-mortalidad para la dosis mayor (4.25×10^7), a través de un análisis de Probitas, calculándose la dosis letal media (DL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo con agitación

El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas en los dos momentos de evaluación. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como puede observarse, el hongo produjo biomasa en todos los medios utilizados, sin embargo se destaca el medio de boniato – extracto de levadura, el cual difiere del resto de los tratamientos en las dos evaluaciones. Se registró a los siete y nueve días un valor de 5.46 y 8.24 (g.L^{-1}) de masa seca respectivamente. El menor valor en la producción de masa seca se obtuvo en el medio de cultivo, boniato – cloruro de calcio en las dos evaluaciones realizadas, sin diferencias significativas con el medio constituido a base de boniato – extracto de levadura – cloruro de calcio.

El extracto de levadura se ha utilizado frecuentemente como componente de medios de cultivo agarizados o líquidos para hongos entomopatógenos con buenos resultados, entre ellos *N. rileyi* (6,

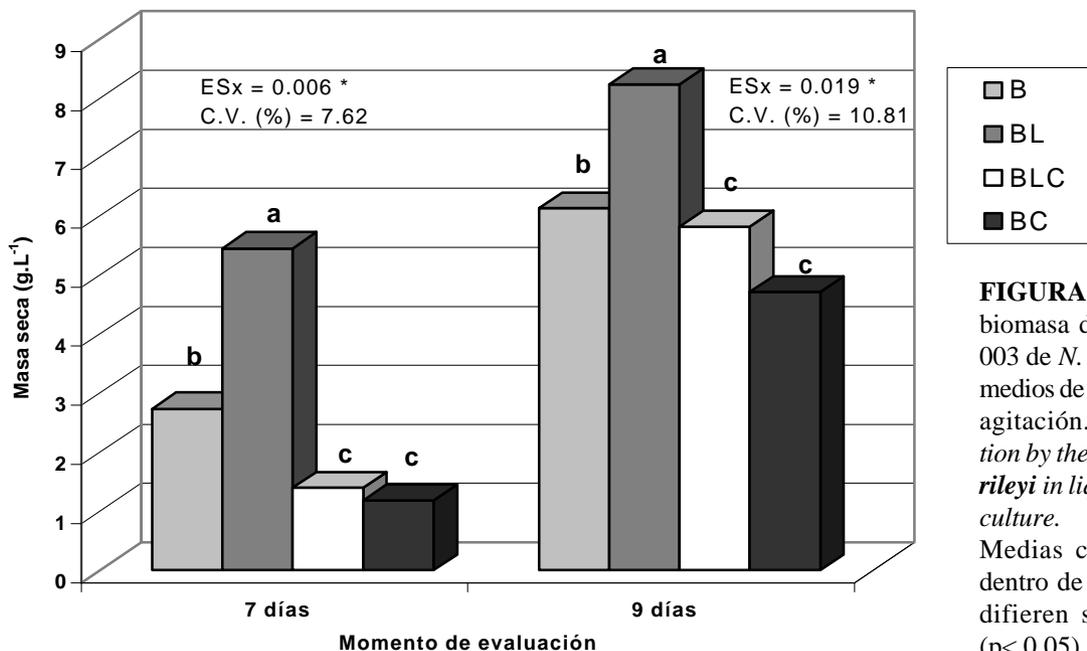


FIGURA 1. Producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación. / *Biomass production by the strain Nr-003 of N. rileyi* in liquid media in shake culture. Medias con letras iguales, dentro de cada momento, no difieren significativamente ($p < 0.05$).

10,12,13). Por otro lado, se han obtenido buenos resultados para el desarrollo micelial cuando se combinó el boniato con extracto de levadura (9), y fue precisamente en esa combinación donde se registró la mayor producción de biomasa.

A pesar de que en los medios de cultivos antes estudiados, la producción de biomasa es buena, en el medio de melaza (20 mL.L⁻¹) – extracto de levadura (20 g.L⁻¹) es superior, ya que se alcanzan mayores valores de la misma (9); razón por la cual se utiliza este medio de cultivo líquido en el ensayo que a continuación se muestra.

Dinámica de producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi*

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (momento de evaluación). En la Figura 2 se muestra la curva de formación de masa seca con respecto al tiempo. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre los dos últimos momentos de evaluación, donde se produjo la mayor cantidad de biomasa, pero estos a su vez, si difieren de los demás momentos evaluados.

Se observó que en el primer momento de evaluación (12 h) ya había formación de biomasa. Otros autores han reportado una rápida formación de masa

seca en medios de cultivo líquidos en agitación, constatando que diferentes especies de hongos comienzan a formar biomasa desde que se pone en contacto el inóculo con el medio de cultivo (14).

Después del primer momento de evaluación (12h) se aprecia como el hongo crece continuamente, experimentando un crecimiento rápido a partir de las 60h, donde comienza lo que se conoce como fase de crecimiento exponencial. A partir de las 108h, aumenta la producción de biomasa hasta un punto donde parece estabilizarse dicha producción (fase de meseta).

Según los resultados de este ensayo, el medio sólido se puede inocular, cuando la producción de micelios en medios líquidos en agitación alcanza un tiempo que va de las 48 a las 96 horas, intervalo de tiempo que constituye la fase del crecimiento exponencial; siendo este momento el más adecuado para inocular el medio sólido en la producción bifásica de hongos entomopatógenos (14).

Virulencia del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda*

El análisis estadístico realizado con los datos de mortalidad para el aislamiento Nr-003 del hongo entomopatógeno *N. rileyi* mostró diferencias significativas en todos los momentos de evaluación, no ocurriendo ninguna muerte en el testigo (Tabla 1).

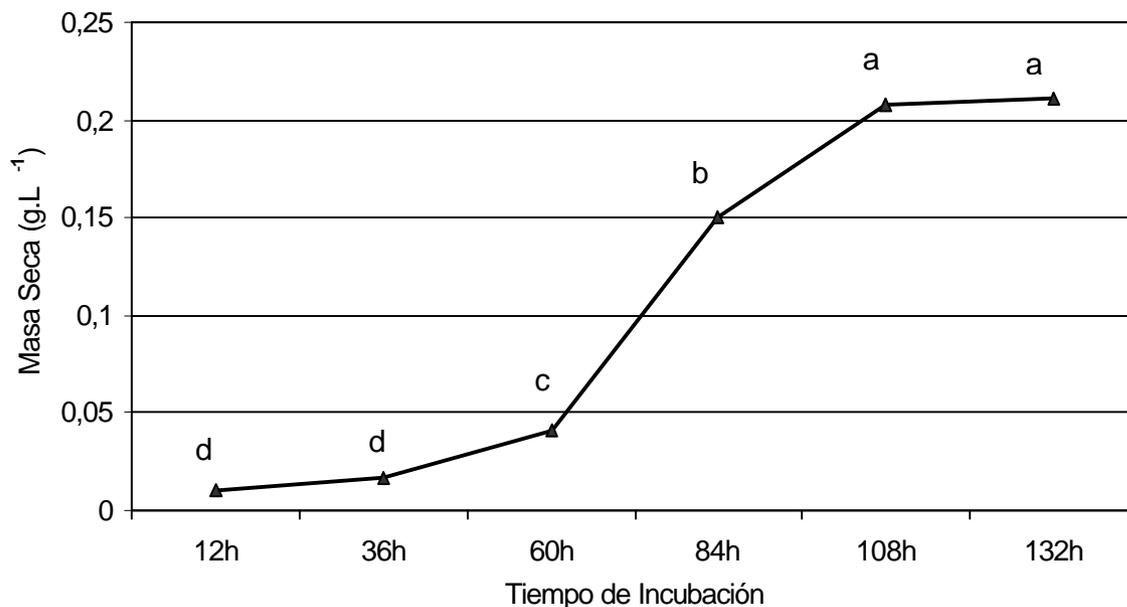


FIGURA 2. Dinámica de producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi*. / Dynamics of the biomass production by the strain Nr-003 of *N. rileyi*.

Medias con letras iguales, dentro de cada serie, no difieren significativamente de ($p < 0.05$).

TABLA 1. Mortalidad (%) de larvas de *S. frugiperda* por el aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes momentos./ *Mortality (%) of S. frugiperda larvae by the strain Nr-003 of N. rileyi at different moments*

Dosis (Conidios.mL ⁻¹)	4 días		5 días		7 días	
	X orig. (%)	X transf.	X orig. (%)	X transf.	X orig. (%)	X transf.
4.25 x 10 ⁷	30.00	0.63 a	56.66	0.91a	90.00	1.35 a
4.25 x 10 ⁶	13.33	0.44 b	46.66	0.80 a	66.66	1.02 b
4.25 x 10 ⁵	6.66	0.34 bc	26.66	0.60 b	40.00	0.73 c
4.25 x 10 ⁴	0.00	0.23 c	26.66	0.60 b	26.66	0.60 c
Testigo	0.00	0.23 c	0.00	0.23 c	0.00	0.23 d
ESx	-	0.05*	-	0.06*	-	0.05*
C.V. (%)	-	19.44	-	13.56	-	10.30

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente de ($p < 0.05$)

En la evaluación realizada a los cuatro días, se observan diferencias significativas entre la dosis mayor con relación a las demás. Con la menor concentración no se produjo mortalidad. Estos resultados corroboran lo señalado por distintos autores al evaluar la mortalidad producida por otros aislamientos, aunque con un porcentaje más bajo, al emplear un aislamiento nativo de esta especie obtenido en la misma localidad (9).

A los cinco días se aprecia que no hay diferencias significativas entre las dosis mayores, mientras que las dosis menores tampoco difieren entre sí, porque no logran sobrepasar el 30% de mortalidad. A los siete días se alcanzó una mortalidad del 90% en la dosis más alta, valor este que lo hace diferir del resto de los tratamientos. En otros trabajos realizados se ha logrado hasta un 96% de mortalidad en igual tiempo cuando se han empleado aislamientos nativos de *N. rileyi* (7, 11, 17).

Los datos de mortalidad acumulada a las 168h, evidencian que existe una correlación positiva entre la concentración de conidios y la mortalidad según nos indica el coeficiente de regresión. La DL₅₀ a las 168h fue de 9.7x10⁵ conidios.mL⁻¹ (Tabla 2).

TABLA 2. Virulencia del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda*./ *Virulence of the strain Nr-003 of N. rileyi on S. frugiperda larvae*

Indicadores	
Ecuación: dosis-mortalidad	Y = 2.3 + 0.68x
DL ₅₀ (conidios. mL ⁻¹) a las 168h	9.7 x 10 ⁵
Ecuación: tiempo-mortalidad	Y = -38.98 + 10.87x
TL ₅₀ en horas (10 ⁷)	111.5

En el caso del análisis tiempo-mortalidad, realizado con los datos obtenidos para la concentración 4.25x10⁷ conidios.mL⁻¹, también se evidenció que existe una relación positiva entre el tiempo y la mortalidad de las larvas de *S. frugiperda* registrándose una TL₅₀ de 111.5h.

Los resultados obtenidos para el aislamiento Nr-003 en cuanto a la dosis letal media son similares a los informados por otros autores (18). Sin embargo, estos parámetros pueden variar de acuerdo al hospedante y la resistencia del mismo al entomopatógeno (21,22). Trabajando con un aislamiento nativo de *N. rileyi* (Nr-001) se obtuvo una DL₅₀ a las 168h de 4.9x10⁵ conidios.mL⁻¹, resultado muy similar al obtenido con el aislamiento Nr-003 (9).

Comparando los resultados con estos mismos autores respecto a la TL₅₀ podemos constatar que Nr-003 puede provocar mortalidad en la mitad de la población en 111.5 h (4.6 días), mientras que Nr-001 y Nr-002 tienen como TL₅₀ 137.5 h (5.72 días) y 164 h (6.87 días), respectivamente. Todo lo anterior confirma que distintos aislamientos de un microorganismo entomopatógeno pueden presentar diferencias en su virulencia sobre un mismo insecto (2, 15).

REFERENCIAS

- Alatorre, R. (2001): Hongos entomopatógenos. En: *Memorias XII Curso Nacional de Control Biológico*. Guigón, C.; Guzmán M.; y Barajas, G. (Eds.). Sociedad Mexicana de Control Biológico, 9-10 de agosto de 2001, Chihuahua, México, p. 169-179.
- Badilla, F. y Alves, S. (1991): Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vaurel con *Beauveria brongniarti* en condiciones de laboratorio y campo. *Manejo Integrado de Plagas*. 10(20): 34-38.

3. Cuadra, R.; Castañeda, R. y Rodríguez, N. (2000): Patogenicidad de una cepa cubana de *Paecilomyces fumosoroseus* sobre *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.* 15(2): 114-117.
4. Cuadra, R.; Perales, M.; Pedroza, E.; Cruz, X.; Soto, L. y Zayas, M. (2005): Producción de bioplaguicidas confeccionados con productos o subproductos agrícolas de las Huasteca Hidalguense de México. *Rev. Protección Veg.* 20(2): 110-113.
5. Cumbre de la Tierra + 5 sobre periodo extraordinario de la asamblea general para el examen y la evolución de la aplicación del programa 21(1:1997: New York, 23-27 julio. EUA).
6. Devi, U.; Mohan, C.; Padmavathi, J. y Ramesh, K. (2003): Susceptibility to Fungi of Cotton BollWorms Before and After a Natural Epizootic of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Biocontrol Sci. Technol.* 13(3): 367-371.
7. Edelstein, J.; Lecuona, R. y Trumper, E. (2004): Selection of Culture and *in vitro* Assessment of Temperatura-Dependent Development of *Nomuraea rileyi*. *Neotrop. Entomol.* 33(6): 737-742.
8. García, I. y del Pozo, E. (2002): Obtención y aislamiento de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su virulencia en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). En: *Tecnologías Ecológicas para el agro*. Editora RAP-AL, Lima, p. 47-64.
9. García, I.; del Pozo, E.; Méndez, A.; Céspedes, Y. (2006): Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento Nr-003, en diferentes medios de cultivos líquidos, con agitación. *Rev. Protección Veg.* 21(3): 173-177.
10. Han, Q.; Inglis, G. y Hausner, G. (2002): Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as revealed by partial β -tubulin sequences and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 376-383.
11. Hauxwell, C. (2002): Biopesticides. Recent developments of value for broad acre cropping. (En línea). Disponible en: <http://www.dpi.gld.gov.au/fieldcrops/3535.html>. (Consulta: 10-06-2002).
12. Kassa, A.; Stephan, D.; Vidal, S. y Zimmermann, G. (2004): Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. *Mycol. Res.* 108: 93-100.
13. Im, D.; Lee, M.; Aguda, R. y Rombach, M. (1988): Effect of nutrients and pH on the growth and sporulation of four entomogenous hypomycetes fungi (Deuteromycotina). *Korean J. Appl. Entomol.* 27(1): 41-46.
14. Jenkins, N.; Heviefo, G. y Jürgen, L. (1998): Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol New and Inf.* 19(1): 21-31.
15. Jiménez, G. (1992): Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Cenicafé.* 43(3): 84-98.
16. Lacey, L.; Frutos, R.; Kaya, H. K. y Vail, P. (2001): Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biol. Control*, 21: 230-248.
17. Lezama, R.; Alatorre, R.; Hernández, L. y González, H. (1993): Sensibilidad *in vitro* de larvas del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) a los hongos *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith, y *Nomuraea rileyi* (F) Samson. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 2(1): 90-99.
18. Piedra, F.; Pérez, E. y Blanco, E. (1997): *Manejo integrado de palomilla del maíz (Spodoptera frugiperda* J. E. Smith). Ciudad de la Habana. Ediciones Pueblo y Educación. 73p.
19. Sharma, Sh.; Gupta, R. y Yadava, C. (1999): Mass multiplication and formulation of entomopathogenic fungi and their efficacy against whitegrubs. *J. Mycol. Plant Pathol.* 29(3): 299-305.
20. Sosa, R.; Delpin, K.; Moscardi, F. y Nozaki, M. (2003): The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. *Neotrop Entomol.* 32(2): 287-291.
21. Tang, C. y Hou, R. (2001): Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Ent.* 125: 243-248.
22. Wilson, K.; Cotter, C.; Reeson, A. y Pell, J. (2001): Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.* 4: 637-649.
23. Zambrano, C.; Sepúlveda, M.; Zambrano, E.; y Molina, N. (2003): Hongos entomopatógenos en Venezuela: *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Caracterización, formulación, producción y aplicación. (En línea) Disponible en: <http://pegasus.ucla.edu/ve/CCC/RESUMEN/agronomia/c1-32-ag.htm>. (Consulta: 4-03-2006).

(Recibido 24-1-2007; Aceptado 30-4-2007)