



MANUAL

Reproducción de hongos entomopatógenos

En colaboración con

Juan Enrique Rojo Salomón
Jesús Manuel Mancillas Paredes
Colectivo Trágame Tierra



Introducción

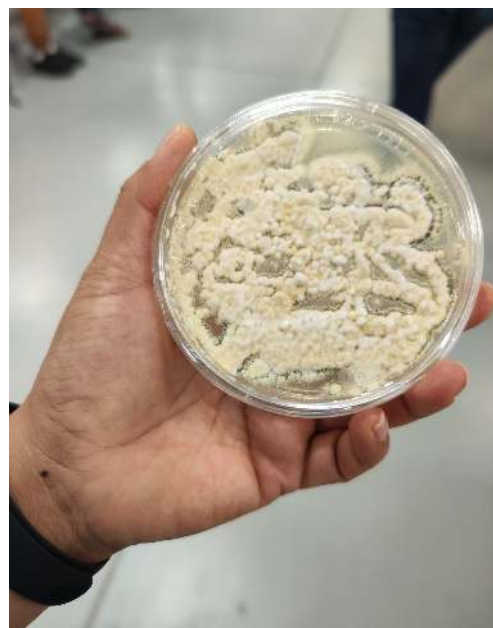
Como parte del seguimiento a la implementación de prototipos resultantes del Diplomado ABC 3.0, el viernes 05 de mayo de 2023 se llevó a cabo el taller de reproducción de hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* impartido por Juan Enrique Rojo y Jesús Manuel Mancillas Paredes, en el Centro de Estudios e Investigación en Biocultura, Agroecología, Ambiente y Salud-Guerrero. Asistieron 16 estudiantes de Costa Grande, Montaña y Costa Chica con proyectos colectivos o individuales, personales o profesionales de transición agroecológica, la mayor parte en colaboración con productores de mango, maíz, café o coco.

El conocimiento para la reproducción de estos hongos entomopatógenos es de gran utilidad, dado que estos son organismos con la capacidad de causar enfermedades a una gran diversidad de insectos: cuando sus esporas entran en contacto con insectos susceptibles, estas germinan y crecen directamente hacia el interior del cuerpo de su hospedero (insecto), por lo que el hongo prolifera a través del cuerpo y eventualmente lo destruye (Pacheco Hernández et al., 2019). Esta característica hace que estos hongos sean un grupo de organismos utilizados como alternativa al uso de pesticidas en los cultivos.

Este manual desglosa los pasos a seguir para realizar la reproducción de cepas previamente aisladas bajo un proceso riguroso de selección de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, cuyas características y usos generales pueden encontrarse en el [anexo](#) de este manual.



Cocotero (*Rhynchophorus palmarum*) infectado con *Beauveria bassiana*



Caja de petri con cepa de *Beauveria bassiana* aislada.

Consideraciones iniciales

Aunque la reproducción de hongos entomopatógenos es una práctica sencilla, requiere de condiciones de mucha higiene para garantizar que en el cultivo no crezcan microorganismos invasores que disminuyan la calidad de las cepas.

Se recomienda el uso y aplicación de cepas nativas del lugar en el que se aplicarán, pues serán microorganismos mejor adaptados a las condiciones ambientales de nuestros terrenos y cultivos; por ello, un paso previo para llevar a cabo la metodología aquí descrita consiste en la recolección, identificación, aislamiento, prueba y reproducción del hongo benéfico que se haya encontrado en nuestros suelos.



Trampa de arroz en suelo con hongos entomopatógenos sin aislar

Algunas alternativas para realizar este paso previo es la colocación de trampas de arroz en el suelo o el uso de insectos trampa. Se sugiere consultar material específico para cada uno de estos procedimientos.

Materiales

- Bolsas de poliseda
- Arroz blanco
- Cánulas intramamarias de metal
- Matraz de 1000 mililitros (mL)
- Autoclave u olla de presión
- Campana de flujo laminar*
- Mecheros de alcohol
- Jeringas de 60 mL
- Alcohol al 96
- Cajas Petri
- Estantes de plástico
- Sellador de bolsas*
- Asa bacteriológica
- Cloro
- Agua de la llave
- Agua destilada
- Enroxil al 5% o virkon
- Enroflox o tetraciclina líquida
- Papel aluminio
- Guantes
- Cubrebocas
- Caja grande de plástico
- Malla cielo o tela limpia

*Se comenta una alternativa en el desarrollo del manual

Metodología

1. Preparación del arroz

- Desinfectar el área de trabajo con alcohol a 96°.
- Colocar la malla cielo dentro de la caja de plástico, agregar el arroz junto los 8.7 litros de agua de la llave y aplicar 1 mL de antibiótico enroxil al 5% por cada litro de agua de lallave (si se usa virkon se aplican 10 gramos por cada litro).



Como proporción general, para preparar 50 kg arroz de necesita revolver en 28 litros de agua, en este caso de ocuparon 14.4 kg de arroz en 8.7 litros de agua.

- Lavar el arroz con el agua y antibiótico, dejar reposar por 10 minutos y volver mezclar. Dejar reposar otros 10 minutos y retirar toda el agua utilizando la malla como colador.
- Agregar entre 350 y 400 gramos de arroz en cada bolsa de poliseda, distribuir de manera uniforme el arroz en las bolsas y sellarlas con el sellador¹ procurando no dejar demasiado aire dentro.



¹ El sellador de bolsas se puede reemplazar utilizando una vela o una plancha.

2. Esterilización del material y del arroz

- Esterilizar (en autoclave o en olla de presión) dos litros de agua destilada, junto con los matraces y las asas bacteriológicas que se usarán para recuperar las cepas. Para este procedimiento se recomienda calentar la olla o autoclave hasta llegar a los 15 psi y, a partir de ahí, se toman aproximadamente 15 minutos para terminar la esterilización (no se debe dejar más de 20 min después de llegar a los 15 psi).



- Posteriormente se precocen las bolsas con arroz en el autoclave u olla de presión usando el mismo método de esterilización del paso anterior.



- Estando precocido el arroz, se colocan las bolsas en una superficie previamente desinfectada y se espera a que se enfríen hasta temperatura ambiente. Esto es importante ya que el hongo no resiste temperaturas altas.



3. Raspado del hongo

- Cuando el arroz tenga la temperatura ideal se hace el raspado del hongo a reproducir² de la siguiente manera:

a) Se prenden los mecheros y se colocan a los lados del área en la que se realizará el procedimiento. Al mismo tiempo se toman los vasos de precipitado previamente llenados con agua destilada y esterilizada.

b) Se conectan las cánulas intramamarias en las jeringas de 60 mL y con ellas se toman 10 mL del agua de uno de los vasos de precipitado. Se vierten esos 10 mL en la caja Petri que contiene el hongo entomopatógeno cultivado y se raspa cuidadosamente la caja con el asa.

c) Se hace una clase de "lavado" de la caja de Petri, de tal manera que el cultivo de hongos quede impregnado en el agua destilada. La solución que va resultando de este proceso se vierte al mismo vaso de precipitado en donde está el resto del agua destilada.



² En esta ocasión el hongo a inocular ya se tenía cultivado en cajas Petri

d) Esta técnica se repite hasta que ya no se observe micelio en la caja. Se recomienda remover el líquido del vaso después de cada llenado de jeringa; esto se puede hacer con el asa o vertiendo con fuerza parte de la misma solución con la jeringa para que el agua se agite.



Es importante mantener cerca los mecheros³ durante todo el proceso para crear un área estéril. Es recomendable usar cánulas de metal que puedan esterilizarse con el mechero tras cada uso.

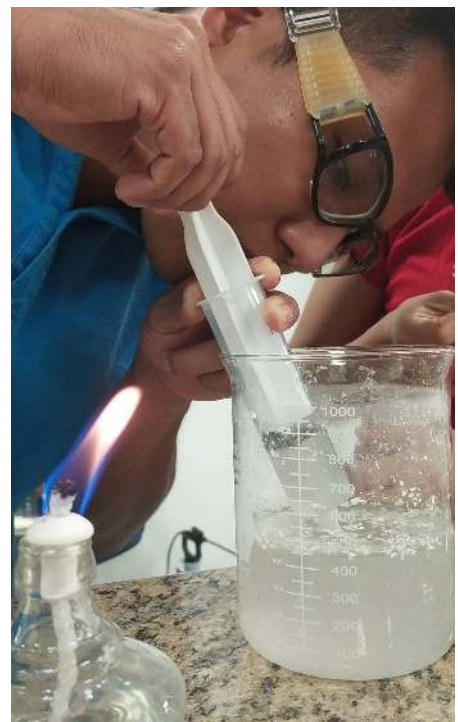


4. Solución de microorganismos para la reproducción

- Teniendo la solución de agua destilada con los hongos, se le agrega 1 mL de antibiótico Enroflox y se procede a inyectar las esporas del hongo en las bolsas de arroz. Con la misma jeringa que se usó en el raspado, se toman 25 mL de la solución y se inyectan a cada bolsa.



En este caso se reprodujeron dos especies diferentes de hongos por lo que se usó diferente asa bacteriológica, jeringa y cánulas.



³ La colocación de los mecheros es una alternativa al uso de Campana de flujo laminar

- Una vez aplicada la solución en la bolsa, se masajea por unos segundos para esparcirla en todo el arroz. Por último la bolsa se marca con un plumón colocando las iniciales del hongo que se le inyectó, así como la fecha de inoculación.



5. Guardado del cultivo

- Se preparan los cuartos donde se van a guardar las bolsas ya con la solución de microorganismos, para ello, se necesita desinfectar el área con una solución de 1 litro de agua con 1 litro de cloro.
- Se guardan las bolsas en el cuarto colocándolas en un estante y cuidando que ninguna esté arriba de otra. En caso de no tener suficiente espacio, se pueden colocar en el suelo previamente desinfectado. Si se trabaja con diferentes hongos, se recomienda utilizar un cuarto distinto para cada uno.



En el caso de *Metarhizium anisopliae* se conservan por 3 días sin luz y posteriormente se le hacen hoyos en las bolsas con una aguja estéril, se descompacta el arroz. Después de eso se deja otros 12 días con la luz prendida. Para *Beauveria bassiana* se mantiene el cuarto sin luz por 12 días; después de los primeros 3 días se descompactan y se voltean las bolsas



6. Secado y almacenamiento

- Una vez pasados los días requeridos para la reproducción del hongo, se recomienda secar el arroz para que el cultivo pueda almacenarse por más tiempo. Para ello, se vacía el arroz (se saca de la bolsa) y se dejan durante 2 a 5 días en un ambiente con poca humedad, de preferencia a una temperatura promedio de 18° C. Aunque la temperatura puede variar, es importante cuidar la humedad para evitar que el arroz se pudra.
- El arroz seco ya contendrá el cultivo de hongos y estará listo para su aplicación. Si desea almacenarse, sólo se guarda en bolsas, de preferencia en un lugar con poca humedad.



Si no se tienen condiciones para el secado, se puede utilizar el cultivo con el arroz húmedo. Para ello, se saca de la bolsa y se enjuaga; el agua resultante se aplica y el arroz enjuagado se puede sembrar para aprovechar en el suelo los hongos que ahí queden.



7. Aplicación

- Se muele el arroz con el cultivo y se diluye en agua en la siguiente proporción: 50 gr de arroz molido por 200 litros de agua. Esta cantidad es suficiente para aplicar en una hectárea de cultivo de manera foliar o directamente en raíz.
- Para aumentar el tiempo de vida del hongo y obtener mejores resultados en la aplicación, se recomienda hacer la siguiente mezcla: se agregan 200 gr de polvo de diatomeas, 50 gr de azúcar glass y al final se añaden 50 gr de arroz con hongos. El polvo de diatomeas sirve para que el hongo se fije mejor a la planta y el azúcar glass aumenta la vida de anaquel del hongo si desea guardarse por más tiempo



Consideraciones finales

- La cantidad de veces que se aplique el hongo depende del tipo de cultivo y plaga que se esté tratando. Es importante ir observando los resultados durante las aplicaciones.
- Para una mayor eficacia se recomienda que la aplicación sea directa sobre la plaga; p. ej. para combatir termitas, con alguna vara remover su camino o picotear el nido para que estas estén expuestas a la solución.
- La aplicación de estos organismos se recomienda a partir de las 17:00 horas en adelante, ya que es cuando las estomas de las plantas están abiertas y la temperatura del ambiente es menos caliente, lo que ayuda a la viabilidad de la instalación de los hongos.

Anexos

Características y usos generales de *Beauveria bassiana*

- Es uno de los más utilizados como control biológico. Es un hongo que infecta más de 200 especies de insectos, sin embargo, su uso como controlador biológico se ha centrado en algunos insectos plaga como hormigas, trips, picudo de algodón, picudo de banano, mosquita blanca, palomillas, gusanos barrenadores y langostas; en México, se ha utilizado principalmente contra la broca que afecta los cafetos. Entre las ventajas de su uso está el que las cepas de este hongo pueden encontrarse de manera natural en los predios de cultivo, de donde se puede tomar para su aislamiento y reproducción; su ciclo de maduración es de aproximadamente 15 días (Hernández & Berlanga, 1999; Sebastian Blanco, Andrea Sirio, 2022).

Características y usos generales de *Metarhizium anisopliae*

- Junto con *Beauveria bassiana*, es uno de los hongos más utilizados comercialmente para el control biológico de plagas. En muchas ocasiones se utiliza en conjunto con *Beauveria* para mejores resultados, ya que ambos tienen diferente método de infección en los insectos. Los insectos plaga en los que se ha utilizado más son el gusano blanco, la araña roja, polillas, termitas, saltamontes, langosta, entre otros (Hernández-Rosas et al., 2019).

Referencias

- Pacheco Hernández, M. de L., Reséndiz Martínez, J. F., & Arriola Padilla, V. J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10(56), 1–32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
- Hernández-Rosas, F., García-Pacheco, L. A., Figueroa-Rodríguez, K. A., Figueroa-Sandoval, B., Salinas Ruiz, J., Sangerman-Jarquín, D. M., & Díaz-Sánchez, E. L. (2019). Análisis de las investigaciones sobre *Metarhizium anisopliae* en los últimos 40 años. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 22, 155–166. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1866>
- Hernández, V., & Berlanga, A. (1999). Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172882/Ficha_CB_03_Beauveria_bassiana.pdf
- Sebastian Blanco, Andrea Sirio, S. R. (2022). Uso de Bioinsecticidas: *Beauveria bassiana*. https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/51284/RIUNNE_FCA_AR_Blanco-Sirio-Roldan.pdf?sequence=1&isAllowed=y