

**UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN AGRICULTURA ECOLÓGICA**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO ACAROPATÓGENO
Hirsutella nodulosa Petch**

Ruth León González

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2022**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado en
Agricultura Ecológica de la Escuela de Ciencias Agrarias, para optar por el grado
de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica.**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN MASIVA DEL HONGO ACAROPATÓGENO**

***Hirsutella nodulosa* Petch**

Ruth León González

Tesis presentada para optar al grado de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

[PhD. Mayela Coto Chotto/ Dr. Luis A. Miranda Calderón, Dr. Francisco San Lee Campos, Dr.
Rafael Arias Ramírez]
Representante del Consejo Central de Posgrado

Ph.D. Martha Orozco Aceves
Coordinadora Maestría en Agricultura Ecológica

M. Sc. Eduardo Hidalgo Jaminson
Tutor de Tesis

M. Sc. Allan González Herrera
Miembro del Comité Asesor

Ph.D. Martha Orozco Aceves
Miembro del Comité Asesor

Ruth León González
Sustentante

Descriptor

Hongo acaropatógeno, *Hirsutella* sp., *Steneotarsonemus spinky*, medios de cultivo, crecimiento radial, blastosporas.

Resumen

El hongo *Hirsutella nodulosa* Petch es un importante enemigo natural de ácaros fitófagos. En Costa Rica, durante el 2014 se encontró en diferentes plantaciones arroceras parasitando al ácaro del arroz *Steneotarsonemus pinki* Smiley. Lo anterior motivó el interés y la necesidad de evaluar la utilización de *Hirsutella nodulosa* en programas de manejo biológico e integrado de este ácaro plaga. Para lograr lo anterior se requiere disponer de un medio de cultivo sencillo, económico y eficiente que permita la producción a gran escala de inóculo para realizar aplicaciones inundativas a nivel de campo. Por esta razón, en la presente investigación se evaluaron 12 medios de cultivo, sólidos y líquidos, con diferentes fuentes y concentraciones de nutrientes y estimulantes para el desarrollo de *H. nodulosa*, con el fin de determinar cuál medio de cultivo es más apto para la producción de propágulos infectivos.

El efecto del medio sólido sobre el crecimiento del hongo fue evaluado como crecimiento radial en el tiempo y producción de conidios, mientras que para el desempeño de los tratamientos líquidos se evaluó la producción de blastosporas y micelio. Los resultados mostraron que en todos los medios nutritivos se produjo crecimiento del hongo; sin embargo, existieron diferencias significativas entre los mismos y con respecto al testigo absoluto (medio agar agua). En el caso de los medios sólidos, los mayores crecimientos radiales, sin existir diferencias significativas entre ellos, se dieron en los medios de cultivo V8 ($8,33 \pm 0,73$ mm) entre los 27 y 34 días después de la inoculación, seguido del medio H + quitina ($7,0 \pm 0,69$ mm) entre los 30 y 34 días, y medio papa + zanahoria ($6,50 \pm 0,73$ mm) a los 34 días. En cuanto a los medios líquidos, los medios H y medio E fueron los que presentaron mayores concentraciones de blastosporas en menor tiempo; no obstante, el medio E continuó produciendo blastosporas durante más tiempo.

La reproducción del *H. nodulosa* en medio bifásico (uso de inóculo producido en medio líquido + matriz sólida de arroz) fue evaluada como parte del proceso de escalamiento productivo del hongo. Los resultados indicaron que la producción de conidios por gramo de arroz fue diferente en función del medio líquido donde se produjo el inóculo (constituido por blastosporas); por ejemplo, la producción de

conidios en la matriz de arroz fue mayor cuando el inóculo provino del medio glucosa + maltosa (169,5 conidios/g arroz), seguido por PDA (137 conidios/g arroz), y medio E (70,5 conidios/g arroz).

El análisis económico de la producción de *H. nodulosa* en los diferentes medios reveló que el medio de cultivo sólido con la mayor rentabilidad fue el medio H + quitosano, con una relación costo/rendimiento de 0,28 colones por cada millón de conidios. Por otro lado, el medio de cultivo líquido más rentable fue el medio E con una relación costo/rendimiento de 0,12 colones por cada millón de blastosporas. La información indicó que, entre más conidios o blastosporas se producen, el medio se vuelve más rentable.

Con los datos obtenidos de la evaluación de medios sólidos, líquidos y producción bifásica, se propuso el siguiente protocolo para optimizar la reproducción de *H. nodulosa*: 1- purificación del inóculo en alguno de los siguientes medios sólidos: H1, H2 o medio E; 2- fermentación entre los 2 y 11 días utilizando alguno de los siguientes medios líquidos: PDA, SDA, E, H + quitina, H + quitosano, H1, H2 y glucosa + maltosa; y 3- inoculación de arroz esterilizado como sustrato sólido, permitiendo un tiempo de crecimiento y desarrollo del hongo de 10 días para obtener la mayor concentración de conidios (entre los 50 y 170 conidios/g arroz).

Finalmente se establecen algunas consideraciones prácticas para incorporar el uso de *H. nodulosa* como controlador biológico de *S. spinky* en una estrategia de manejo integral de plagas en plantaciones de arroz, éstas incluyen aspectos de monitoreo, momentos de aplicación, uso de plaguicidas y otros.

Abstract

Hirsutella nodulosa Petch is an important natural enemy of phytophagous mites. In Costa Rica, in 2014 *H. nodulosa* strains were isolated from rice plantations, in which they were parasitizing individuals of the rice mite *Steneotarsonemus spinki* Smiley. The finding triggered motivation and interest to commence a deeper investigation on the fungus, aiming its incorporation in an integrated pest management to control *S. spinki* and other plagues as a biological control tactic. To achieve this, it is necessary to reproduce the fungus in an efficient and affordable culture media, so as scaling up production of the inoculum to obtain massive concentrations of propagules for inundative applications in the field. In this study, I evaluated 12 types of culture media; both, solid and liquid media that contained different sources and concentrations of nutrients and growth stimulants, to determine the most suitable to produce infective propagules of *H. nodulosa*.

The efficiency of solid culture media was assessed by measuring radial growth through time and production of conidia by *H. nodulosa*. The efficiency of liquid culture media was assessed by measuring production of blastospores and mycelium. The results evidenced that the fungus grew in all culture media, however, there were significant differences among growth rates according to culture media types and with respect to the absolute control (water agar medium).

In the case of solid culture media, the largest radial growths, with no significant differences among them, occurred in the V8 culture medium (8.33 ± 0.73 mm) between 27 and 34 days after inoculation, followed by H + chitin medium (7.0 ± 0.69 mm) between 30 and 34 days, and potato + carrot medium (6.50 ± 0.73 mm) at 34 days. Regarding the liquid media, *H. nodulosa* produced the highest concentrations of blastospores in the shortest periods of time in H and E media; however, the fungus produced blastospores for a longer period in E media.

The reproduction of *H. nodulosa* in biphasic medium (inoculum produced in liquid medium + solid rice matrix) was evaluated as part of the scaling up reproduction process of the fungus. The results

indicated a differential rate of conidia production per gram of rice according to the liquid medium where the inoculum (blastospores) was produced. For example, the production of conidia in the rice matrix was higher when the inoculum came from the glucose + maltose medium (169.5 conidia/g rice), followed by PDA (137 conidia/g rice), and E medium (70.5 conidia/g rice).

The economic analysis of biomass production by *H. nodulosa* in the culture media revealed that the most profitable solid culture media was H + chitosan medium, with a cost/benefit relation of 0.28 colones per million conidia. On the other hand, the most profitable liquid culture medium was E medium with a cost/benefit relation of 0.12 colones per million blastospores. The data indicated that the more conidia or blastospores are produced, the more profitable the culture medium becomes.

According to the information on the performance of *H. nodulosa*, obtained from the assessments of solid, liquid and biphasic culture media, the following protocol was proposed to optimize the reproduction of the fungus: 1- purification of the inoculum in one of the following solid culture media: H1, H2 or E ; 2- fermentation for 2 to 11 days in one of the following liquid culture media: PDA, SDA, E, H + chitin, H + chitosan, H1, H2 or glucose + maltose; and 3- inoculation of sterilized rice as solid substrate, and incubation period of 10 days to obtain the highest concentration of conidia (between 50 and 170 conidia/g rice).

Finally, the document describe some practical considerations to incorporate the use of *H. nodulosa* as a biological controller of *S. spinky* in an integrated pest management strategy in rice plantations, these include aspects of monitoring, application times, use of pesticides and others.

Agradecimiento

Al Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria INTA.

A mis compañeros: Ing. Jeannette Avilés Chaves de la Estación Experimental Carlos Durán; MSc. Luis Guillermo Vargas Cartagena, Fitopatólogo del INTA; al Téc. Oscar Bravo Bonilla y al Téc. Gustavo Aguilar Flores de Dpto. Laboratorios del INTA. A Guillermo Soro Bonilla y Jeannette Vega Gómez de la Estación Experimental Carlos Durán por sus valiosos aportes en mantener las cepas y el acompañamiento en la ejecución de la evaluación de los medios. A Ph.D. Eduardo Hidalgo Jaminson de CABI-Plantwise Country Coordinador del programa CABI- Plantwise para Centro América y el Caribe. A Ph.D. Miguel Obregón Gómez (QdDg) de Control Biológico. A Ph.D. Víctor Manuel Cartín Leiva Entomólogo. Al Laboratorio de Polímeros, Escuela de Química, Universidad Nacional por proporcionar el quitosano y la quitina. A Ing. Xiomara Mata del Instituto Nacional de Aprendizaje por brindarme el tratamiento siete. A Ximena Loria Espinoza por proporcionarme el tratamiento seis. A Ing. Ovidio Carvajal Acosta por su asistencia en el ensayo. A Julie Soroze, estudiante pasante de biología en Francia. A MSc. Alejandro Vargas Martínez de la ECA-UNA por su ayuda en los análisis estadísticos. A Ing. Carlos Hidalgo Ardón y Dra. Martha Orozco Aceves Coordinadora Maestría en Agricultura Ecológica ECA-UNA por la revisión y sus sugerencias en lo escrito. A Ing. Luis Alfonso Sánchez Chacón Economista Agrícola del INTA por la elaboración de los costos/beneficio de cada medio líquido y sólido.

A todos aquellos que de una u otra forma colaboraron para el desarrollo de esta investigación, así como a mis compañeros de la Maestría.

A todos los agricultores de mi país, por todas sus enseñanzas.

Dedicatoria

A Dios, y a la virgen María quienes reinan en mi corazón

A la memoria de mi Padre: Ricardo León Delgado

A la memoria de mi madre: Faustina González Sandoval

A mi esposo: Luis Enrique Espinoza García

A mis hijos: Diana, Andrea y Juan José Espinoza León

A mis nietas: Camila Brenes Espinoza y Clara Cordero Espinoza

A mi yerno Kenneth Cordero Cortés

A mis tíos Felipe y Gerardo González Sandoval

Gracias

Por su paciencia y consideración

Índice

Descriptores.....	iv
Resumen	v
Abstract	vii
Agradecimiento	ix
Dedicatoria	x
Índice	xi
Lista de tablas	xiv
Lista de figuras.....	xv
Lista de anexos	xvii
Capítulo I: Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
Justificación	1
Objetivos de la investigación	4
Capítulo II: Marco Teórico.....	5
El género <i>Hirsutella</i> Pech 1926 (Deuteromycota: Moniliales).....	5
Mecanismos de acción de <i>Hirsutella</i> contra ácaros.....	6
<i>Hirsutella nodulosa</i>	7
Manejo integrado de las poblaciones del ácaro <i>Steneotarsonemus spinki</i>	9
Prácticas agronómicas	10
Manejo varietal	10
Manejo químico.....	11
Manejo biológico.....	12
Aspectos generales del ácaro <i>Steneotarsonemus spinki</i>	12
Distribución geográfica del ácaro <i>Steneotarsonemus spinki</i>	13
Biología y descripción del ácaro <i>Steneotarsonemus spinki</i>	14
Ciclo de vida	15
Ecología de <i>Steneotarsonemus spinki</i>	18
Hábitat y dispersión	18
Hospedantes alternos	19
Reproducción de agentes microbianos de control biológico.....	19

Selección de medios de cultivo para reproducción del acaropatógeno <i>Hirsutella nodulosa</i>	20
Capítulo III: Metodología	22
Ubicación del experimento	22
Evaluación de medios sólidos para producción de biomasa por <i>Hirsutella nodulosa</i>	22
<i>Medios de cultivo</i>	22
<i>Composición de medios de cultivo sólidos</i>	23
Preparación de medios de cultivo sólidos	24
Establecimiento del ensayo de crecimiento de <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo sólidos	25
Variables evaluadas	26
Crecimiento radial	26
Producción de conidios	27
Diseño experimental	28
Evaluación de medios líquidos para la producción de propágulos por <i>Hirsutella nodulosa</i>	29
<i>Composición y preparación de los medios de cultivo líquidos</i>	29
<i>Establecimiento del ensayo de crecimiento de Hirsutella nodulosa en medios de cultivo líquidos</i>	29
Variables evaluadas	31
<i>Producción de blastosporas</i>	31
<i>Producción de biomasa</i>	32
Diseño Experimental	33
Análisis estadístico	34
Producción bifásica de <i>Hirsutella nodulosa</i>	35
<i>Preparación de matrices</i>	35
<i>Producción de conidios</i>	37
Cálculo de la relación costo/beneficio de la producción de <i>Hirsutella nodulosa</i> en matrices bifásicas	38
Capítulo IV: Análisis e interpretación de los resultados	40
Evaluación de medios sólidos para producción de biomasa por <i>Hirsutella nodulosa</i>	40
<i>Crecimiento radial</i>	40
<i>Producción de conidios</i>	43
Relación entre producción de conidios y micelio por <i>Hirsutella nodulosa</i>	45
Evaluación de medios líquidos para la producción de propágulos por <i>Hirsutella nodulosa</i>	47
<i>Producción de blastosporas</i>	47
<i>Producción de biomasa</i>	52

Producción bifásica de <i>Hirsutella nodulosa</i>	53
<i>Producción de conidios</i>	53
Relación costo/beneficio	56
Consideraciones para el uso de <i>Hirsutella nodulosa</i> en campo	60
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones	62
Conclusiones	62
Recomendaciones	64
Bibliografía	65
Anexos	70

Lista de tablas

Tabla 1. Preferencia de variedades de arroz por parte del ácaro <i>Steneotarsonemus pinki</i>	11
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo usados para evaluar la producción de biomasa de <i>Hirsutella nodulosa</i>	23
Tabla 3. Crecimiento radial promedio de <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo sólidos, incubados en cámara bioclimática.	42
Tabla 4. Producción de conidios por <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo sólidos.	44
Tabla 5. Producción de conidios y micelio por <i>Hirsutella nodulosa</i> en diferentes medios de cultivo sólidos.	46
Tabla 6. Producción de blastosporas del hongo <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo líquidos, incubados en cámara bioclimática (26°C, 5% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas luz).	49
Tabla 7. Biomasa seca producida por <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo líquidos.	52
Tabla 8. Producción promedio (blastosporas/mL) y producción de biomasa (micelio) de <i>Hirsutella nodulosa</i> en diferentes medios de cultivo líquidos.	53
Tabla 9. Conteo de conidios producidos en matrices de arroz inoculadas con blastosporas producidas en diversos medios de cultivo líquidos.	55
Tabla 10. Costos de los medios de cultivo evaluados. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021...	57
Tabla 11. Rentabilidad de los medios líquidos según los costos de producción de blastosporas de cada tratamiento. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021.	58
Tabla 12. Rentabilidad de los medios sólidos según los costos de producción de conidios de cada tratamiento. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021.	59

Lista de figuras

Figura 1. <i>Steneotarsonemus spinki</i> parasitado por <i>Hirsutella nodulosa</i> , cubierto de micelio blanquecino y brillante lo cual le permite establecerse a las vainas de las hojas del arroz	6
Figura 2. Micelio, células conidiogénicas y conidio de <i>Hirsutella nodulosa</i> (120 x).	7
Figura 3. Tipos de esporas asexuales.	9
Figura 4. Ácaros en vaina de arroz.	14
Figura 5. Vista esquemática de <i>Steneotarsonemus spinki</i> . A la izquierda, vistas dorsal y ventral de la hembra. A la derecha, vistas dorsal y ventral del macho.	15
Figura 6. Huevos y ninfas de <i>Steneotarsonemus spinki</i> en vaina de arroz.	16
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Steneotarsonemus spinki</i> a 25°C.	17
Figura 8. Proceso de preparación de los diferentes medios nutritivos. A-D) Mezcla de los diferentes nutrientes. E) Medición de pH. F-G) Platos con hongo purificado listo para hacer las inoculaciones.	25
Figura 9. Inoculación de <i>H. nodulosa</i> en medios sólidos. A) Cada medio de cultivo fue inoculado con un bocado circular de <i>H. nodulosa</i> de 3 mm de diámetro. B-C) Platos marcados con tres ejes en diferentes direcciones conteniendo el bocado circular en el punto de intersección de los ejes.	26
Figura 10. Cosecha de conidios de <i>Hirsutella nodulosa</i> . A) Raspado del medio. B) Suspensión de material fúngico en agua destilada + Tween 20. C) Agitación de las suspensiones de material fúngico.	27
Figura 11. Conteo de esporas de <i>Hirsutella nodulosa</i> A) Cámara de Levy. B) Rayado de Neubauer.	28
Figura 12. Estructura de parcelas y subparcelas del ensayo de crecimiento de <i>Hirsutella nodulosa</i> en los diferentes medios nutritivos sólidos.	29
Figura 13. Inoculación de los diferentes medios de cultivo líquidos.	30
Figura 14. A-B) Producción de propágulos por parte de <i>Hirsutella nodulosa</i> en diferentes medios de cultivo líquidos.	30
Figura 15. A) Cámara de Neubauer conteniendo la producción de blastosporas en condiciones de agitación orbital producidas en medio H. B) Escasa producción de blastosporas en el tratamiento testigo (agar agua). C) Formación de micelio en medio H.	31
Figura 16. A-C) Cámara de Neubauer conteniendo blastosporas de <i>Hirsutella nodulosa</i> en medio H + quitosano. Tamaño promedio aproximado de las blastosporas es de entre 3,88-7,63 μm	31
Figura 17. A) Proceso de filtrado. B) Biomasa obtenida luego del filtrado. C) Pesaje de micelio.	32
Figura 18. Biomasa obtenida de los diferentes tratamientos filtrados con papel de Whatman® y secados en horno a 25°C durante 5 días.	32
Figura 19. Estructura de parcelas y subparcelas del ensayo de crecimiento de <i>Hirsutella nodulosa</i> en los diferentes medios nutritivos líquidos.	33
Figura 20. Inoculación de blastosporas y micelio de los diferentes medios líquidos en matrices de arroz.	36
Figura 21. Inoculación de micelio y propágulos de los diferentes medios sólidos en matrices de arroz. ...	37
Figura 22. Crecimiento radial de <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivo sólidos a los 27 días de incubación.	41
Figura 23. Curvas de crecimiento radial de <i>Hirsutella nodulosa</i> en medios de cultivos sólidos. DDI = Días después de inoculados	42
Figura 24. A) Preparación de medio de cultivo con jugo de vegetales (V8). B-C) Crecimiento del hongo <i>Hirsutella nodulosa</i> en el medio V8.	43

Figura 25. Estructuras de <i>Hirsutella nodulosa</i> A) En círculo fiálides del hongo, con forma de cabeza de fósforo encendido. B) Micelio y fiálides obsérvese los conidios adherida a la fiálides. C) Fiálides sin conidio curvado con cuello sinuoso.....	44
Figura 26. A) <i>Preparado del medio H + quitosano</i> . B-C) <i>Crecimiento del hongo Hirsutella nodulosa en el medio H + quitosano</i>	46
Figura 27. Curvas de producción de blastosporas (por ml) de <i>Hirsutella nodulosa</i> en el tiempo, utilizando diferentes medios líquidos.....	50
Figura 28. A) Producción de blastosporas en condiciones de agitación orbital en medio líquido H + quitosano. B) Formación de micelio del medio líquido H + quitosano.....	51
Figura 29. Estructuras de <i>Hirsutella nodulosa</i> producidas en matrices de arroz: A) micelio y fiálides, B) conidios.....	54

Lista de anexos

Anexo 1. Medición de pH y temperatura de medios sólidos. Laboratorio de Fitoprotección INTA-CR 2018.	70
Anexo 2. Medición de pH de cada uno de los tratamientos líquidos. Laboratorio de Fitoprotección INTA- CR 2018.	70
Anexo 3. Análisis de los datos para los medios de cultivo sólidos.....	71
Anexo 4. Análisis de los datos para los medios de cultivo líquidos.	74
<i>Anexo 5. Costo por litro de los medios líquidos evaluados.</i>	<i>78</i>
<i>Anexo 6. Costo por litro de los medios sólidos evaluados.....</i>	<i>78</i>
Anexo 7. Curvas de producción de blastosporas en los medios líquidos.	79

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El ácaro fitófago *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) causa severos daños en el cultivo del arroz de manera directa (por producción de toxinas) e indirecta (por diseminación de microorganismos patógenos) (Ramos y Rodríguez, 2000; Almaguel, *et al.*, 2002; García, *et al.*, 2002; Santos, *et al.*, 2004), produciendo cuantiosas pérdidas (5 – 90% de la producción) (Ou, *et al.*, 1977; Jiang, *et al.*, 1994; Cheng y Chiu, 1999; Almaguel, *et al.*, 2000; Rao, *et al.*, 2000; Ramos y Rodríguez, 2001; Xu, *et al.*, 2001; García, 2005). Los daños causados por *S. spinky* son críticos en países como Costa Rica, debido a que el arroz constituye uno de los principales alimentos de la dieta básica de los costarricenses. A pesar de la importancia de esta afectación y los esfuerzos realizados, el ácaro ha sido difícil de controlar mediante métodos químicos (acaricidas), debido a que estas sustancias no alcanzan a penetrar al interior de la vaina de la hoja y en las espigas, lugares donde se ubican (alimentan) los ácaros. Por otro lado, el uso continuo de acaricidas ha promovido el desarrollo de resistencia en estos organismos como respuesta de supervivencia ante condiciones adversas (Rosas, *et al.*, 2003).

Justificación

En la naturaleza los ácaros fitófagos presentan varios enemigos naturales, entre los que destacan los hongos acaropatógenos, específicamente los entomofthorales y deuteromicetos (Chandler, *et al.*, 2000; Van Der Geest, *et al.*, 2000). Estos hongos pueden causar importantes descensos en las poblaciones de ácaros (Roberts y Campbell, 1977). Sin embargo, los cambiantes factores ambientales (temperatura, humedad y la radiación solar), afectan directa o indirectamente la persistencia y la sobrevivencia de este tipo de hongos. De manera que, para compensar la mortalidad natural y maximizar su sobrevivencia en el ambiente, muchas de estas especies producen elevadas

cantidades de esporas; clamidosporas, blastosporas y otras estructuras de resistencia, además de exudados y toxinas como bien lo menciona Rosas, *et al.* (2003).

Dentro de los deuteromycetes, el género *Hirsutella* ha presentado resultados promisorios para incorporarse en una estrategia de manejo integrado de ácaros fitófagos, en el marco del principio de la Agroecología, que indica que el manejo de organismos no deseados debe basarse en interacciones naturales de antagonismo. El género *Hirsutella* comprende más de 35 especies que atacan ácaros, y otros insectos de los órdenes Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Orthoptera y Lepidoptera (Rosas, *et al.*, 2003). Uno de los mecanismos de acción de *Hirsutella* sp. es la producción de la toxina Hirsutellina B (HTB), lo cual contribuye a que *Hirsutella* sp. presente amplia variedad de hospederos porque es inespecífica; ya que además de parasitar ácaros como *Phyllocoptruta oleivora*, produce mortalidad de diferentes especies de áfidos, larvas de *Aedes aegypti* o *Plutella xylostela* (MamLoy, *et al.*, 1992).

Además, de la producción de HTB, *Hirsutella* sp. presenta otros mecanismos de acción; por ejemplo; la producción de redes pegajosas donde los ácaros quedan atrapados, muriendo posteriormente por inanición (Cabrera, *et al.*, 2005). Las primeras observaciones de *Hirsutella* sp. parasitando ácaros se remontan a 1924 por Spears y Yothers, quienes observaron ácaros eriófidos de la naranja *Phyllocoptruta oleivora* parasitados en Florida. En 1949 Fisher y colaboradores describieron una epizootia causada por *Hirsutella thompsonii* sobre *P. oleivora*, donde los eriófidos se tornaban lentos en sus movimientos y cambiaban de coloración. En el año 2005 Cabrera y colaboradores evidenciaron la patogenicidad de *H. nodulosa* contra *S. spinki* en el cultivo del arroz. Los estudios realizados por los autores demostraron una mortalidad hasta de un 71% del ácaro, y la presencia del hongo hasta en un 70% de la población. En Costa Rica durante el 2004, *H. nodulosa* fue aislado por Reinaldo Cabrera, investigador invitado de Cuba, parasitando *S. spinki*; además en ese mismo año fue recolectado, identificado y conservado en el Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de

Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) para ser estudiado y reproducido (León, 2004). A partir de este momento, se planteó la posibilidad de utilizar este hongo como parte de una estrategia para el control biológico de *S. spinky* en arroz.

Una desventaja del uso de *H. nodulosa* en el manejo de *S. spinky* en arroz, es que su producción masiva ha estado limitada por la falta de información que identifique fuentes de nutrientes que puedan ser utilizados eficientemente por el hongo, de alta disponibilidad para su reproducción y bajo costo (McCoy, *et al.*, 1978; Van Winkelhoff y McCoy, 1984). De manera que, tomando en consideración que *H. nodulosa* es actualmente uno de los biorreguladores más importantes de *S. spinky*, existe el interés en buscar nuevas alternativas para su multiplicación y reproducción a gran escala.

Para la reproducción de hongos acaropatógenos en medios de cultivo artificiales con fines de producción en masa, es necesario proporcionarles los nutrientes necesarios para mantener su capacidad parasitaria. Por ejemplo, la incorporación de quitina-oligosacáridos (derivados del hidrólisis enzimática de la quitina), al medio de cultivo utilizado como sustrato de fermentación para reproducción de *H. nodulosa* ha incrementado la tasa de crecimiento del hongo. Otros productos como la cutícula de chapulín desproteínizada también han sido utilizados como sustratos para el crecimiento de otros hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* con éxito (Jiménez, 2016).

Por otro lado, condiciones ambientales específicas, pueden propiciar la producción de esporas de propagación (conidios,) o de esporas de resistencia (clamidosporas) (Estrada y Ramírez, 2019). Toda esta información es relevante en la producción de enemigos naturales, ya que da la pauta para desarrollar procesos de escalamiento productivo desde plato Petri hasta fermentación en masa, así como desarrollo de matrices para reproducción y posterior aplicación en campo, con la finalidad de ofrecer al sector arrocero costarricense un método alternativo, eficiente de manejo de *S. spinky*.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Proponer y evaluar aspectos técnico-metodológicos orientados a la producción masiva del hongo entomopatógeno *Hirsutella nodulosa*, con el fin de incorporarlo en una estrategia de manejo del ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley en el cultivo de arroz.

Objetivos específicos

- Determinar la velocidad de crecimiento de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo sólidos con diversas composiciones para establecer las condiciones nutrimentales en las cuales el hongo produce biomasa (micelio y conidios) con mayor rapidez.
- Medir la producción de micelio y blastosporas por *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo líquidos con diversas composiciones para establecer las condiciones nutrimentales de mayor producción de biomasa.
- Evaluar un sustrato a base de arroz para la reproducción masiva de *Hirsutella nodulosa* con el fin de obtener un producto y poder determinar aspectos económicos relacionados con su producción.

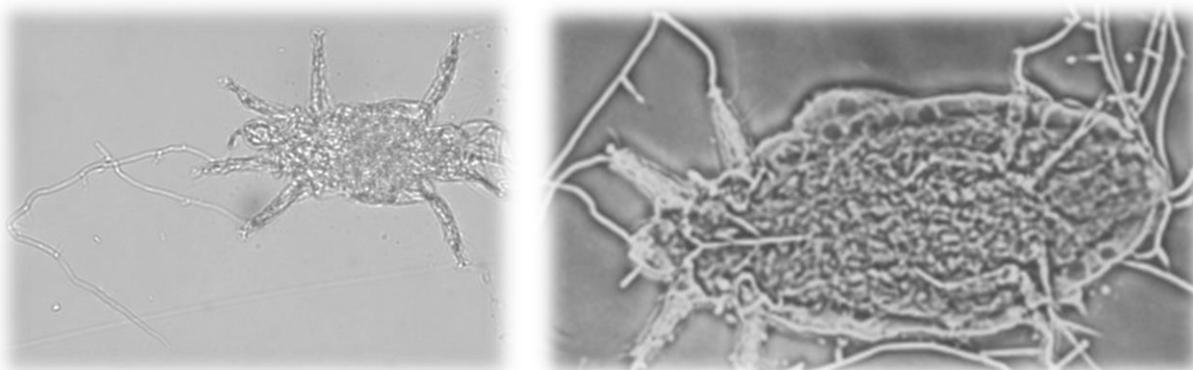
Capítulo II: Marco Teórico

El género *Hirsutella* Pech 1926 (Deuteromycota: Moniliales)

El género *Hirsutella* fue descrito por Patouillard en 1892, siendo registrado como un Basidiomycete de la familia Clavariaceae. Ya para 1920, Speare lo ubicó en el Orden Moniliales (McLead, 1959), el cual contiene una variedad de hongos patógenos aislados de ácaros, nematodos e insectos. Por ejemplo, las especies *Hirsutella nodulosa*, *H. citriformis* y *H. gigantea*, infectan lepidópteros, hemípteros y dípteros, produciendo estructuras compuestas de un grupo compacto de conidióforos erectos (sinemas), mientras que *H. rhossiliensis* y *H. minnesotensis* infectan nematodos fitoparásitos. En el caso específico de hongos acaropatógenos, la mayoría de estudios se han realizado sobre *H. thompsonii* (Tigano, et al., 2006).

Diversas especies de *Hirsutella* infectan ácaros carroñeros, insectos, nematodos fitoparásitos y ácaros (Figura 1). Este género contiene especies con dos tipos de patrones o hábitos de crecimiento: “mononematosas y sinematosas”. Las especies sinematosas a menudo presentan bultos de hifas ramificados que emergen del insecto con fiálides producidas a lo largo del sinema. Cada fiálide tiene la base ensanchada, la cual se extiende y se va disminuyendo hasta un cuello estrecho, donde se ubica un único conidio cubierto por mucus. El tamaño y forma del conidio hialino varía (MmLoy, et al., 2009). Es usual encontrar solamente un conidio; sin embargo, ocasionalmente se encuentra dos o más conidios producidos por una única fiálide (Samson, et al., 1988).

Figura 1. *Steneotarsonemus spinki* parasitado por *Hirsutella nodulosa*, cubierto de micelio blanquecino y brillante lo cual le permite establecerse a las vainas de las hojas del arroz



Fuente: Cabrera, *et al.* 2005.

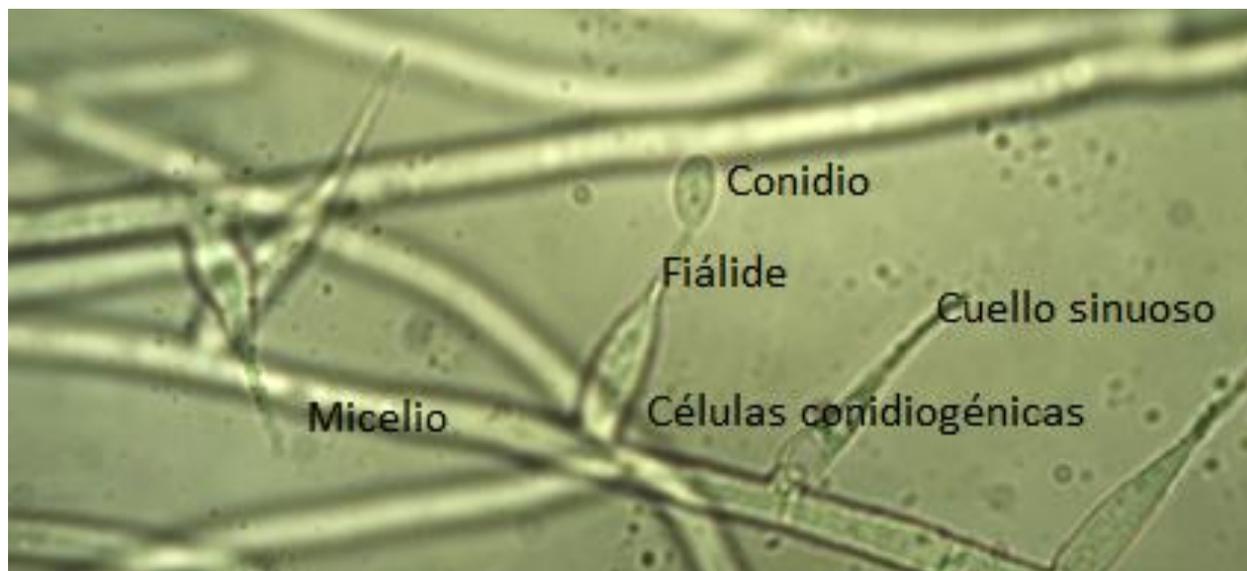
Mecanismos de acción de *Hirsutella* contra ácaros

Téllez, *et al.* (2009) y Quesada, *et al.* (2009) mencionan que el género *Hirsutella* produce muchos compuestos con actividad insecticida y bactericida, tal es el caso de diferentes macromoléculas (> 5-10 kDa) de naturaleza proteica. También se han aislado de *H. thompsonii* las proteínas Hirsutellina A (HtA) e Hirsutellida A aislada (Wei-Zhen, *et al.* 1995); las cuales son ciclohexadepsipéptidos antimicrobianos, además se han identificado los alcaloides antimicrobianos Hirsutellones A-E (Li, *et al.*, 2010). Estos metabolitos producidos por *Hirsutella* tienen varios modos de acción y en muchos casos suelen ser la causa directa de la muerte de los ácaros (Liu, *et al.*, 1996), debido a que afectan a las células especializadas de su sistema inmune. Probablemente este sería el mismo modo de acción que emplea *H. nodulosa* para causar la muerte al ácaro *S. spinki*, ya que hay evidencias que relacionan a la Hirsutellina A con la muerte de ácaros, debido a la supresión de su sistema inmune (Liu, *et al.*, 1996).

Hirsutella nodulosa

Hirsutella nodulosa (Figura 2) se ubica dentro de la clasificación taxonómica División: Amastigomycotina; Subdivisión: Deuteromycotina; Orden: Coloniales; Familia: Moniliaceae (Minter y Brady, 1980). Presenta un micelio septado, hialino, liso o verrugoso en tramos no definidos de las células conidiogénicas, poco ramificado, con hifas de 2,5 a 3,1 μm de anchura cerca de sus bases, las que se estrechan gradualmente hacia uno o más cuellos hialinos y muy a menudo con paredes de aspecto rugoso o verrugoso, monofialídicas con frecuencia polifialídicas con hasta cinco cuellos, pero más a menudo entre uno y tres (Cabrera, *et al.*, 2005).

Figura 2. Micelio, células conidiogénicas y conidio de *Hirsutella nodulosa* (120 x).



Fuente: León, 2019.

Minter y Brady (1980) indican que *H. nodulosa* tiene un micelio espacioso, abundante, inmerso y superficial, hialino, lo cual coincide con la descripción que brindan Cabrera, *et al.* (2005). Al microscopio estereoscópico (32x), los ejemplares de *S. pinki* afectados por esta micosis parecen estar cubiertos por una telaraña blanquecina y brillante, formada por el micelio del hongo que los fija a la superficie de la

cara anterior de las vainas de las hojas del arroz (Cabrera, *et al.*, 2005), por lo que resulta fácil distinguir los síntomas de parasitismo, debido a las largas hifas poco ramificadas. *H. nodulosa* tiene como característica particular, que una vez que sus hifas invaden el cuerpo del hospedero, salen por los segmentos corporales y por los extremos de los seis segmentos de las patas (Fisher, 1950, Cabrera, *et al.*, 2005).

Cabrera, *et al.* (2005), mencionan que en Cuba las diferencias estructurales y morfológicas del hongo aislado de *S. spinki* en el cultivo del arroz concuerdan con las señaladas por Minter y Brady (1980) para la especie *H. nodulosa*, presente sobre *Zeuzera coffea* Nietner. También se ha encontrado en el cultivo de la guayaba (*Psidium guajava*) sobre el ácaro *P. oleivora* (Cabrera, 1987a; MmLoy, *et al.*, 1972, en el cocotero sobre el ácaro *Eriophyes guerreronis* Keifer (Cabrera y Domínguez, 1987); en naranja valencia (*Citrus sinensis*) sobre los ácaros de la familia *Tydeidae* Kramer, *Tydeus californicus* Banks, *Lorryia Formosa* Cooreman y *Polyphagotarsonemus latus* atacados por *H. thompsonii* e *H. nodulosa* (Cabrera, *et al.*, 1978b).

Hirsutella nodulosa produce conidios que es la estructura más común de reproducción asexual de los hongos, y son muy importantes para la dispersión de estos organismos en la naturaleza. Los conidios son células haploides, genéticamente similares a los progenitores, siendo capaces de generar un nuevo organismo si encuentran condiciones favorables. Las células que dan origen a los conidios se denominan células conidiogénicas, las cuales normalmente se localizan en el extremo de hifas especializadas llamadas conidióforos (Estrada y Ramirez, 2019). Otra forma de reproducción asexual es mediante la formación de blastosporas (hifas especializadas), las cuales se producen en medios de cultivo líquidos. Estas estructuras son importantes para la diseminación o multiplicación de la especie (Estrada y Ramirez, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Tipos de esporas asexuales.



Fuente: <https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php>.

La importancia de las blastosporas consiste en que se pueden utilizar para elaborar fórmulas que se pueden utilizar en el control de artrópodos causantes de daños en la agricultura, debido a su rápido crecimiento en el medio de cultivo líquido (García-Gutiérrez, *et al.*, 2013). No obstante, la formación de blastosporas viables dependerá de la composición del medio de cultivo (Riaz, *et al.*, 2013).

Manejo integrado de las poblaciones del ácaro *Steneotarsonemus spinki*

Debido a los hábitos de alimentación y reproducción del ácaro del arroz *S. spinki*, dentro de la vaina de la hoja de las espigas en formación, se presenta el problema para lograr un control efectivo con acaricidas sintéticos. Una de las prácticas enmarcada en el manejo integrado de *S. spinki* es el control biológico con *H. nodulosa*; sin embargo, el manejo integrado comprende varias tácticas entre las cuales destacan:

Prácticas agronómicas

Se recomienda realizar una desinfección antes de la siembra en cada lugar donde se va a sembrar el arroz, ya que pueden quedar focos de infección de la plaga y es por ello que se indica destruir las socas o residuos de cosecha, y la limpieza de las áreas circundantes (Santos, *et al.*, 2004). La densidad de siembra que se recomienda es de 100-120 kg y al voleo de 130-150 kg semilla/ha, en sistema de transplante 15-20 plantas/m². La influencia del manejo de agua sobre la población de ácaros es otro factor a considerar, Hernández, *et al.* (2005) determinaron que el secano favorecido presentó las menores poblaciones y en orden ascendente le siguen: el estrés hídrico, el riego, el riego y secano, y por último el que alcanzó las mayores poblaciones de ácaros fue con lámina permanente. Otras recomendaciones agronómicas apropiadas son: definir la época de siembra, rotación de cultivos y no distribuir la granza en las áreas de cosecha (Sanabria, 2004).

Manejo varietal

En Costa Rica a partir del año 2004 se han realizado estudios sobre la preferencia del ácaro por las variedades comúnmente utilizadas por los productores del país. Se determinó que se forman tres grupos de acuerdo con la densidad de población que presentaron y al daño encontrado en cada una de ellas. Para este estudio se evaluaron 16 variedades de secano, como se advierte en la tabla 1 (León, 2008 y León, 2010).

Tabla 1. Preferencia de variedades de arroz por parte del ácaro *Steneotarsonemus spinki*.

Grupo 1. Variedades menos preferidas	Grupo 2. Variedades medianamente preferidas	Grupo 3. Variedades susceptibles *
Senumisa Hunsá (29)	CFX-18 (2643)	CR-4102 (10449)
INTA 05 (570)	CR-1821(3598)	Inarroz (12641)
Fedearroz-50 (1116)	CR-5272 (4385)	CR-1113 (13355)
Senumisa 3 (1440)		CR-4338 (15882)
CR-4477 (1745)		Setesa 9 (16301)
Senumisa 2 (1777)		INTA 04 (19901)
Palmar 18 (29)		Senumisa 4 (21685)
		Tempisque (12641)

Fuente: Elaboración propia.

* León, 2010.

Manejo químico

Según los especialistas de la Corporación Nacional Arrocera (CONARROZ) (2005), antes de elegir un producto para combatir el ácaro *S. spinky*, se deben realizar monitoreos periódicos y si se determina la presencia del mismo en al menos un 10% de los tallos, hay que considerar la aplicación de algún acaricida. La época de aplicación más apropiada es desde el inicio del primordio a embuchamiento; el nivel crítico para realizar aplicaciones es cuando ese 10% de los tallos tenga al menos un ácaro. Otra observación que se ha realizado es que la época crítica ocurre en la etapa de emergencia de la panícula. El momento de la aplicación varía con la variedad ya que la etapa de desarrollo (fenología) varía en cada una de ellas.

Es sabido que el control químico de *S. spinky* continúa siendo una de las alternativas más utilizadas por los productores, pero es muy costoso y ambientalmente peligroso. El uso de insecticidas no selectivos como piretroides y organofosforados no favorece la presencia de los enemigos naturales del ácaro. Las aplicaciones terrestres deben hacerse con mezclas de mínimo 300 litros/ha y con tractor preferiblemente.

Álvarez (2005) indica que el nicho críptico de este ácaro y su corto ciclo generacional, dificulta la eficiencia de los plaguicidas. Algunos pueden ejercer un control de 5-6 días y luego las poblaciones se disparan. Como se mencionó previamente, el control químico del ácaro se dificulta por la ubicación de éste en el interior de las vainas de las hojas (Reyes, 2005).

Manejo biológico

El hábitat críptico del ácaro obliga a buscar alternativas de controladores que cuenten con la capacidad de ingresar hasta donde están los ácaros en las vainas, al aplicar una concentración adecuada dirigida al cultivo y a los ácaros. En este caso particular, los hongos del género *Hirsutella*, con su toxina Hirsutellina, por su efecto acaricida, son capaces de alcanzar los inaccesibles ácaros y adherirse a ellos para iniciar el proceso de germinación, diferenciación y penetración causando mortalidad y reducciones significativas en la población del ácaro *S. spinki* en el cultivo de arroz.

Aspectos generales del ácaro *Steneotarsonemus spinki*

Steneotarsonemus spinki fue descrito por primera vez en 1967 por Robert L. Smiley de un material recolectado en 1960 sobre el insecto *Sogata orizicola* Muir (*Tagosodes orizicolus* Muir Hemiptera: Delphacidae) en Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos. Taxonómicamente se clasifica en el Filo: Arthropoda, Subfilo: Chelicerata, Clase: Arachnida, Orden: Prostigmata (Actinedida), Familia: Tarsonemidae Canestrini y Fanzago, 1877, género y especie: *S. spinki* Smiley, 1967 (Santos, et al., 2004). Cuenta con un variado número de nombres comunes: “ácaro blanco del arroz”, “ácaro del arroz”, “ácaro tarsonémido del arroz”, “ácaro de la panícula del arroz”, “ácaro del vaneado del arroz”, “tarsonémido de arroz”, entre otros. En Costa Rica le llaman el ácaro del vaneo del arroz.

Steneotarsonemus spinki es considerado como la plaga más importante y destructiva en el cultivo del arroz, causa daños directos, ya que al alimentarse en el interior de la vaina de la hoja y en las espigas, inyecta toxinas y disemina microorganismos que causan daños secundarios a la planta, tales como el hongo *Sarocladium oryzae* (Sawada), el cual causa pudrición de la vaina y manchado del grano como lo indica el OIRSA (2017), enfermedad conocida como “síndrome de la esterilidad de la panícula del arroz”, la cual produce un alto porcentaje de vaneo y consecuentemente, pérdidas en los rendimientos (Ramos y Rodríguez, 2000; Almaguel, *et al.*, 2002; García, *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004).

Distribución geográfica del ácaro *Steneotarsonemus spinki*

De acuerdo a Teng (1978) los primeros indicios de la presencia de este ácaro en el cultivo del arroz se registran en Asia en el año 1930, cuando se menciona que un artrópodo pequeño causaba la esterilidad del arroz en la India, el cual fue identificado en 1978 como *S. spinki* (Santos, *et al.*, 2004). Así mismo Almaguel, *et al* (2002) indican que este ácaro fue encontrado a mediados de 1960 en China, causando pérdidas en los rendimientos entre el 30% y el 90 en el cultivo del arroz, en las segundas siembras (Almaguel, *et al.*, 2002). Smiley, *et al.* (1993) lo reportan como plaga en los países de China, Taiwán y Filipinas (Reissig, *et al.*, 1985; Santos, *et al.*, 2004); Tailandia y Corea (Ho, *et al.*, 1999), así como en Sri Lanka (Cabrera, *et al.*, 2002).

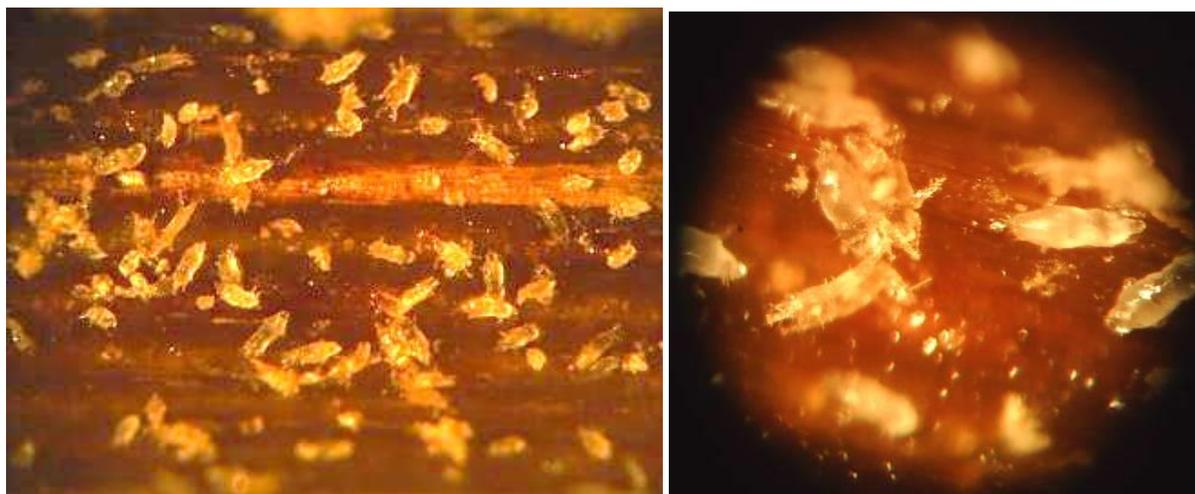
A finales de 1997 fue registrado en Cuba, produciendo daños severos en arroz (Ramos y Rodríguez, 1998) y de acuerdo con lo que reporta Almaguel (2002) ya para el año 1998 el ácaro estaba presente en todas las zonas arroceras de Cuba, con afectaciones en los rendimientos entre un 15 y 20% (Almaguel, 2002). Ramos, *et al* (2001) y Santos, *et al* (2004) indican que en 1998 fue descubierto en República Dominicana, Haití y en Puerto Rico en el 2007. En Centroamérica, se reportó en Panamá en el año 2003, en Costa Rica en el 2004 y en el 2005 en Honduras, Guatemala y Nicaragua. Mientras que en América del Sur fue reportada su presencia en el 2005 en Colombia y en el 2006 en Venezuela (Hummel,

2009). En México se encontró este ácaro en el 2006 y en Estados Unidos en el 2007 (Ramos, *et al.*, 2001; Santos, *et al.*; 2004). En la actualidad en Costa Rica, el ácaro se encuentra en todas las zonas arroceras del país, variando las poblaciones, debido principalmente a la edad del cultivo, momento del muestreo, variedad que siembran en cada región, la temperatura y la humedad relativa¹.

Biología y descripción del ácaro *Steneotarsonemus spinki*

Este ácaro es un organismo extremadamente pequeño, mide entre 100 y 300 μm . Es hialino, con facilidad se confunde con agua, más cuando está mojada la vaina y solo cuando hay altas poblaciones se distinguen, pero es casi imposible de ver a simple vista (León, *s.f*). En las vainas se encuentran en altas poblaciones de todas sus etapas (huevo-larva-ninfa-adulto). En sus inicios su color es translúcido y a medida llega a la adultez su color cambia a amarillo cremoso (Figura 4).

Figura 4. Ácaros en vaina de arroz.

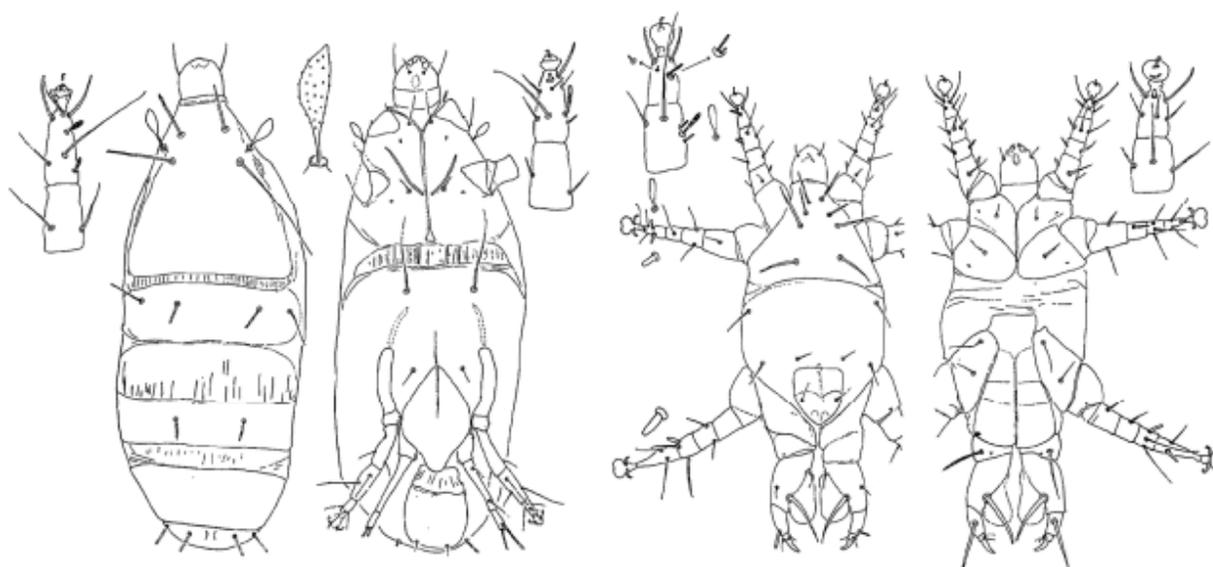


Fuente: R. León, 2018.

¹León R. Estudio poblacional del ácaro del arroz (*Steneotarsonemus spinki*) en las regiones Chorotega, Huetar Norte, Atlántica y Brunca de Costa Rica. 2008. Com. personal.

La hembra tiene un largo y ancho promedio de 272 x 109 μm . Sus órganos pseudoestigmáticos son ovoidales Ramos y Rodríguez (2001). El primer par de apodemas es en forma de “Y”. Los apodemas II son más largos y fuertes Ramos y Rodríguez (2001). El macho tiene un largo y ancho promedio de 217 X 120 μm . Ramos y Rodríguez (2001) mencionan que éste se distingue por la presencia de un par de setas en forma de cuchillo sobre el fémur y la gena IV (Figura 5).

Figura 5. Vista esquemática de *Steneotarsonemus spinki*. A la izquierda, vistas dorsal y ventral de la hembra. A la derecha, vistas dorsal y ventral del macho.



Fuente: Hummel, *et al.*, 2009.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *S. spinki* comprende los estados de huevo (embrionario), larva hexápoda activa la cual pasa a un estado inactivo que para algunos autores es la pupa, larva quiescente o ninfa quiescente y el adulto. Las larvas pueden ser transportadas por los machos, para fundar nuevas colonias, para ello cuentan con una estructura especializada (Santos, *et al.*, 2004). Ramos y Rodríguez (2001), informan que el ciclo de vida en Cuba varía de entre 5 y 9 días, mientras que, en Taiwán, Tseng

(1985) indica que el ciclo oscila entre 16 y 17 días a 25°C. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones climáticas y varietales.

Los huevos son ovipositados individualmente en cantidades de hasta 160 por hembra, son blancos translúcidos, ovoides y alargados puestos en el interior de las vainas. La duración de la eclosión es de aproximadamente dos días, pero en condiciones de 24 a 29°C la etapa de huevo dura apenas unas horas (Ramos y Rodríguez, 2001). Las ninfas también son translúcidas con una placa blanca en la extremidad del idiosoma (Reyes, 2005). El estado inactivo (pupa o larva quiescente) presenta la misma apariencia de larva activa (Reyes, 2005) (Figura 6).

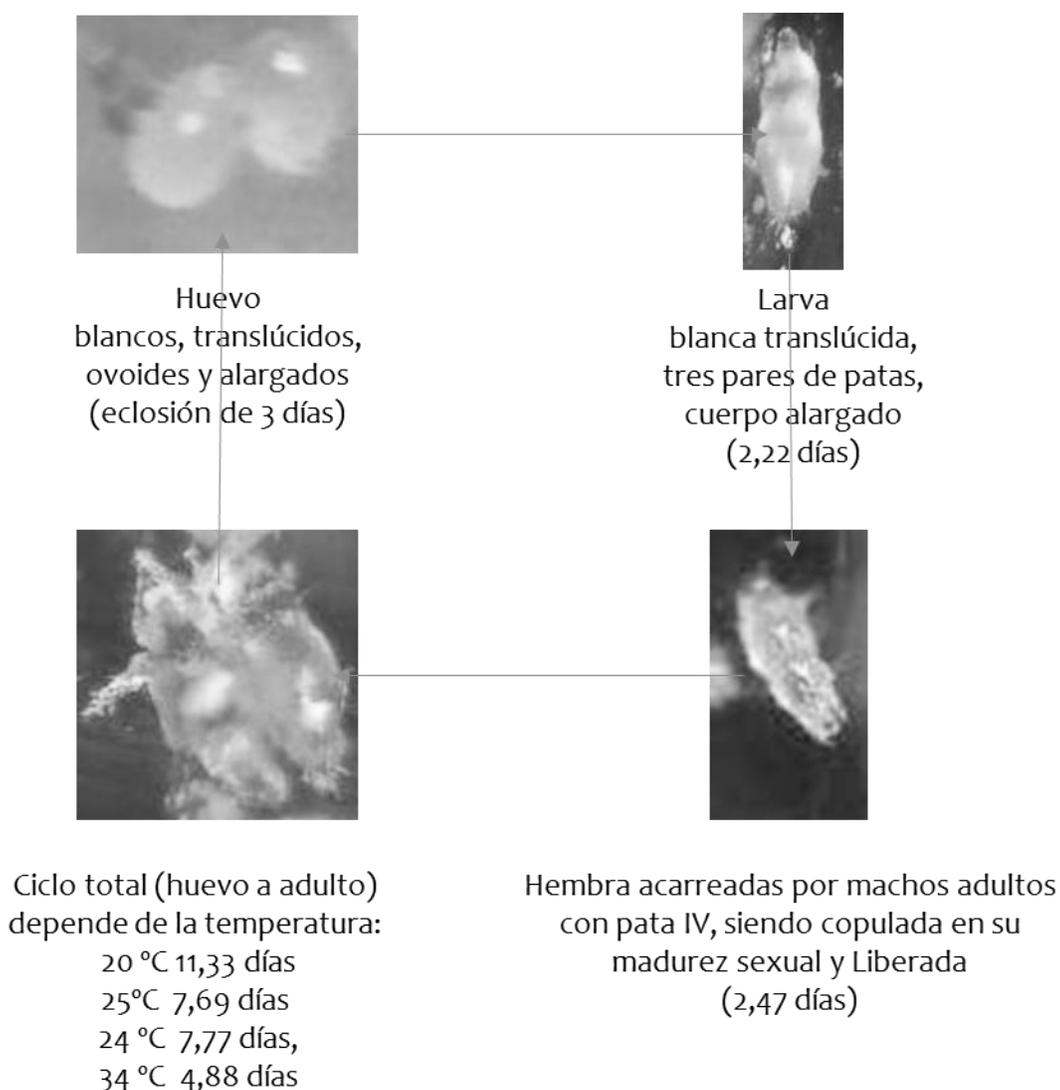
Figura 6. Huevos y ninfas de *Steneotarsonemus spinki* en vaina de arroz.



Fuente: R. León, 2019.

La ninfa eclosiona entre los 3 a 5 días y el adulto sale entre los 6 a 11 días. Este ciclo puede variar a medida que aumenten la temperatura y la humedad, situación que se presenta en las zonas arroceras del país (Figura 7). El ciclo de vida oscila entre los 5 y 7 días (CONARROZ, 2005). Esto significa que la plaga puede presentar hasta casi cinco generaciones por mes, y en los periodos óptimos de desarrollo, en muy pocas semanas sus infestaciones pueden alcanzar altas poblaciones y producir cuantiosos daños, si no se le controla con efectividad.

Figura 7. Ciclo de vida de *Steneotarsonemus pinki* a 25°C.



Fuente: Ramos y Rodríguez, 2000; Santos, *et al* 2002. Figuras: R, León, 2019.

En plantas de la variedad Fedearroz-50 y en condiciones de laboratorio a $27 \pm 3^\circ\text{C}$ y $85 \pm 5\%$ H.R, Toro y Mesa (2015) encontraron que la duración, en días, de los estados inmaduros fue: para huevo, 1,4; para larva, 0,7 para ninfa-pupa de 0,6, de huevo a adulto de 3,5 días. La hembra presentó un periodo de oviposición de 8 días y una longevidad de 8,9 días. Se registró una fecundidad de 43 huevos por hembra y una tasa de oviposición diaria de 4,43. La relación hembra: macho fue de 11,5:1 (Toro y Mesa, 2015).

Ecología de *Steneotarsonemus spinki*

Hábitat y dispersión

El ácaro del arroz se alimenta y reproduce en las zonas húmedas y bien protegidas de la planta, lo que hace muy difícil su detección. Por lo general, alcanza sus máximas poblacionales durante la fase reproductiva del cultivo (Reyes, 2005). En los momentos picos de su desarrollo, puede alcanzar poblaciones superiores a los 300 ácaros por centímetro cuadrado según Reyes (2005). El viento, el agua las precipitaciones, altos contenidos de nitrógeno en las plantas, favorecen estos aumentos poblacionales (Sociedad Entomológica do Brasil, 2005; Almaguel, *et al.*, 2003).

Los daños causados por este ácaro pueden ser directos debido a la alimentación de los ácaros provocando en la planta necrosis, deshidratación y vaneos; e indirectos por la inyección de toxinas durante la alimentación o diseminación de fitopatógenos, especialmente hongos (OIRSA, 2017). *S. spinki* puede invadir el tejido del cultivo por heridas causadas por la masticación o perforación causada por otros insectos o por otros agentes (Santos, *et al.*, 2004).

Algunos estudios realizados por Quirós, *et al.* (2006) en Panamá, mencionan que entre los meses de julio y diciembre ocurren las mayores poblaciones del ácaro; y entre enero y julio sus poblaciones disminuyen, al lograr con ello mayores rendimientos en granos.

Hospedantes alternos

Gamboa, *et al.* (2008) determinaron en Costa Rica la presencia de *S. spinki* en las arvenses *Echinochloa colona*, *Eleusine indica*, *Oryza latifolia* y *Rottboellia cochinchinensis*. Álvarez (2004), indica que *S. spinki* solo se desarrolla en el género *Oryza*, que incluye los llamados “arroz contaminantes” y “arroz rojo”. Sobre la planta invasora *Oryza latifolia* fueron encontrados huevos, larvas y ninfas de *S. spinki*, concluyendo que *S. spinki* puede completar también su ciclo de vida en ese hospedero (Santos, *et al.* 2004; Gamboa, 2009).

Reproducción de agentes microbianos de control biológico

La producción masiva de microorganismos con fines de usarse como controladores biológicos, implica su reproducción en sustratos nutritivos, comúnmente proporcionados mediante medios de cultivo. Los medios de cultivo son mezclas de sustancias químicas que sustituyen parcialmente las propiedades nutricionales del hospedante o sustrato natural del hongo a cultivar (Curvelo y Rojas 2010). La utilidad del medio de cultivo es proporcionar energía al microorganismo, para que desarrolle en la forma más normal posible. También Curvelo y Rojas (2010) indican que la mayoría de los hongos se pueden cultivar de manera sencilla en medios de cultivos adecuados, los cuales deberán contener fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, cobre, molibdeno y otros. En general, las condiciones de cultivo deben promover el crecimiento óptimo del hongo, entre estas; temperatura (entre los 20 a 35 °C), pH (de 5 a 6), humedad (Ríos, *et al.*, 2008).

Selección de medios de cultivo para reproducción del acaropatógeno *Hirsutella nodulosa*

En cuanto a los requerimientos nutricionales de *H. nodulosa* para su reproducción en medios de cultivo, existe muy poca información en la literatura. Una de las experiencias exitosas es la desarrollada por Cabrera, *et al.* (2006), quienes evaluaron un medio simplificado a base de soya con azúcar turbinada de caña con resultados que obtuvieron la producción de 1,14 g de peso seco de micelio de *H. nodulosa* por cada 100 mL de medio (Cabrera, *et al.* 2006). Dentro de los medios donde se ha obtenido buena producción de biomasa, destaca el que consistió en lo siguiente: maltosa 1,5%, glucosa 1%, peptona 1% y agar al 2% (Cabrera y Domínguez, 1987). Es importante mencionar que la composición nutrimental del medio de cultivo, así como las condiciones ambientales de incubación, van a tener una gran influencia sobre las estructuras que *H. nodulosa* produce, lo cual se debe considerar en una metodología de producción masiva y su aplicación al campo. Por ejemplo, hay experiencias de un buen manejo de insectos al usar blastósporas (Ulloa y Hanlin, 2006), tal es el caso del hongo *Iceria fumosoroseus*, cuyas blastósporas causan la mortalidad de todos los estadios de la mosca blanca entre 24 y 48 horas posteriores a su aplicación (Lacey, *et al.*, 1999). Por lo tanto, el sistema de producción masiva de este hongo en particular debería apuntar a la producción de blastósporas para aplicación en campo.

En la práctica, definir las condiciones apropiadas de producción masiva de hongos controladores biológicos no es una tarea sencilla; por ejemplo, *H. gigantea* crece fácilmente en el medio sabouraud-maltosa-agar, pero en este medio el hongo rara vez produce sinemas, y fue generalmente estéril cuando fue transferido a un gran número de medios artificiales estándares, lo cual no resulta conveniente para su aplicación en campo. *Hirsutella thompsonii*, produjo esporulación sobre todos los medios probados; sin embargo, en medios con altos contenidos de nitrógeno y bajo contenido de carbono, mostró un bajo crecimiento y esporulación (MmLoy y Kanavel, 1969). Esto tiene implicaciones prácticas importantes, ya que estudios realizados en campo, indican diferencias en el uso de diversos tipos de estructuras fúngicas. Por ejemplo, *H. thompsonii*, fue aplicado en forma de suspensión de una mezcla de micelio (50

g/L) y conidios (1×10^6 c/mL), para el control biológico del ácaro *Brevipalpus* spp. en *Citrus aurantifolia*, y luego de tres aplicaciones el hongo persistió siete meses en las plantas (Rosas y Sampedro, 1992).

Según Osuna, *et al.* (2003), los propágulos producidos en caldo sumergido son una buena alternativa para la producción comercial de controladores biológicos, ya que se requieren 100 veces menos propágulos para alcanzar mortalidades similares a las logradas con los conidios aéreos. Además, los propágulos en caldo sumergido se pueden obtener en menos de cinco días, mientras que para cosechar los conidios aéreos son necesarios 15 días de incubación. *Hirsutella* spp., tiene buen crecimiento en medios con extracto de levadura, medios con dextrosa, extracto de malta, para la uniformidad de crecimiento en laboratorios. Pero no crece en medios a base de dextrosa con las sales nitrato de potasio o nitrato de amonio. Y para promover una buena efectividad se ha observado que requiere de nitrógeno orgánico (MacLeod, 1959).

Capítulo III: Metodología

Ubicación del experimento

El aislamiento y reproducción de cepas de *Hirsutella nodulosa* se realizó en el laboratorio de la Estación Experimental Carlos Durán del Instituto Nacional de Investigación e Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA-Costa Rica), ubicada en Tierra Blanca de Cartago. Las condiciones ambientales del laboratorio fueron: temperatura promedio de 25°C, humedad relativa entre el 70 y 80%, con fotoperíodo de 12 horas. Las condiciones climáticas externas fueron; temperatura entre los 12 y 18 °C, precipitación media anual entre 100 y 200 mm, evapotranspiración potencial/año entre 71 y 105 cm, altitud de 2300 msnm. El lugar se sitúa en la zona de vida clasificada como bosque húmedo bajo tropical montano (Holdridge, 1947-1987).

Evaluación de medios sólidos para producción de biomasa por *Hirsutella nodulosa*

Medios de cultivo

Se seleccionaron 12 medios de cultivo diferentes, los cuales fueron consultados en la literatura disponible o recomendados por investigadores de diversas instituciones, algunos de ellos fueron modificados para esta investigación. Los medios utilizados se detallan a continuación:

Los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y sabourad dextrosa agar (SDA) son medios muy usados en el aislamiento, reproducción y estimulación de esporulación de hongos entomopatógenos (*Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium (Verticillium)* y *Metarrhizium*) (Cañedo y Ames, 2004). Estos dos medios se evaluaron por ser los medios tradicionales para la reproducción de hongos.

Los medios E y H fueron sugeridos por el investigador Acarólogo José Luis Rosas de México en comunicación personal. Los medios H + quitina, H + quitosano y papa + zanahoria + quitina son modificaciones del medio H a los cuales se les incorporaron las sustancias señaladas. La quitina es

insoluble y es el componente principal del exoesqueleto de los ácaros. El quitosano es un derivado de la quitina, polímero natural de tipo catiónico, biodegradable y no tóxico. Tanto quitina como quitosano se incorporaron a los medios para promover el crecimiento de *H. nodulosa*. Ambos componentes fueron suministrados por el Departamento de Polímeros en la Escuela de Química de la Universidad Nacional.

El medio de cultivo H2 fue un medio utilizado por McLeoy, *et al.* (1972) y se evaluó nuevamente en este estudio. Los medios glucosa + maltosa y papa + zanahoria se incorporaron por sugerencia de la Bióloga Xiomara Mata del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), quien realizó pruebas para la reproducción de este hongo previamente. También se probó un medio con jugo de vegetales (V8) para verificar su efecto como fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo. Finalmente se incorporó el medio agar agua como testigo por ser un medio pobre en el cual el micelio presenta poco crecimiento.

Composición de medios de cultivo sólidos

La composición de los 12 distintos medios de cultivo sólidos para la evaluación de la producción de biomasa (crecimiento radial) de *H. nodulosa* se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo usados para evaluar la producción de biomasa de Hirsutella nodulosa.

Medio de cultivo	Composición
Agar papa dextrosa (PDA)	papa (300 g), dextrosa (20 g), agar (15 g), agua destilada (1 L).
Saboroud papa agar (SDA)	saboreaud (5 g), dextrosa (40 g), agar (15 g), agua destilada (1 L).
Medio E (McCoy y Kanavel, 1969)	dextrosa (10 g), sacarosa (5 g), extracto de levadura (5 g), peptona (0,5 g), agar (18 g), agua destilada (1 L).
Medio H + quitina	quitina de 60 mesh de camarón (<i>Heterocarpus vicarius</i>), dextrosa (5 g), sacarosa (10 g), extracto de levadura (5 g), peptona (0,5 g), agar (15 g), quitina 1% (10 g), agua destilada (1 L).

Medio H + quitosano	quitosano en escamas u hojuelas de camarón (<i>H. vicarius</i>), dextrosa (5 g), sacarosa (10 g), extracto de levadura (5 g), peptona (0,5 g), agar (15 g), quitosano (10 g), agua destilada (1 L).
Medio H1 (Dr. José Luis Rosas)	dextrosa (3 g), sacarosa (10 g), extracto de levadura (0,3 g), peptona (3 g), agar (6 g), agua destilada (600 mL).
Medio H2 (Ing. Reinaldo Cabrera)	dextrosa (5 g), sacarosa (10 g), extracto de levadura (5 g), peptona micológica (0,5 g), agar (16 g), agua destilada (1 L).
Glucosa + maltosa (Cabrera, <i>et al.</i> , 2004)	maltosa (15 g), glucosa (10 g), peptona (10 g), agar (20 g), agua destilada (1 L).
Papa + zanahoria	papa (50 g), zanahoria (50 g), agar (15 g), agua destilada (1 L).
Papa + zanahoria + quitina	papa (50 g), zanahoria (50 g), agar (35 g), quitina (10 g), agua destilada (1 L).
Jugo de vegetales (V8): Agar agua (testigo)	Jugo V8 (100 mL), agar (9 g), CaCO ₃ (1,5 g), agua destilada (500 mL). agar (20 g), agua destilada (1 L).

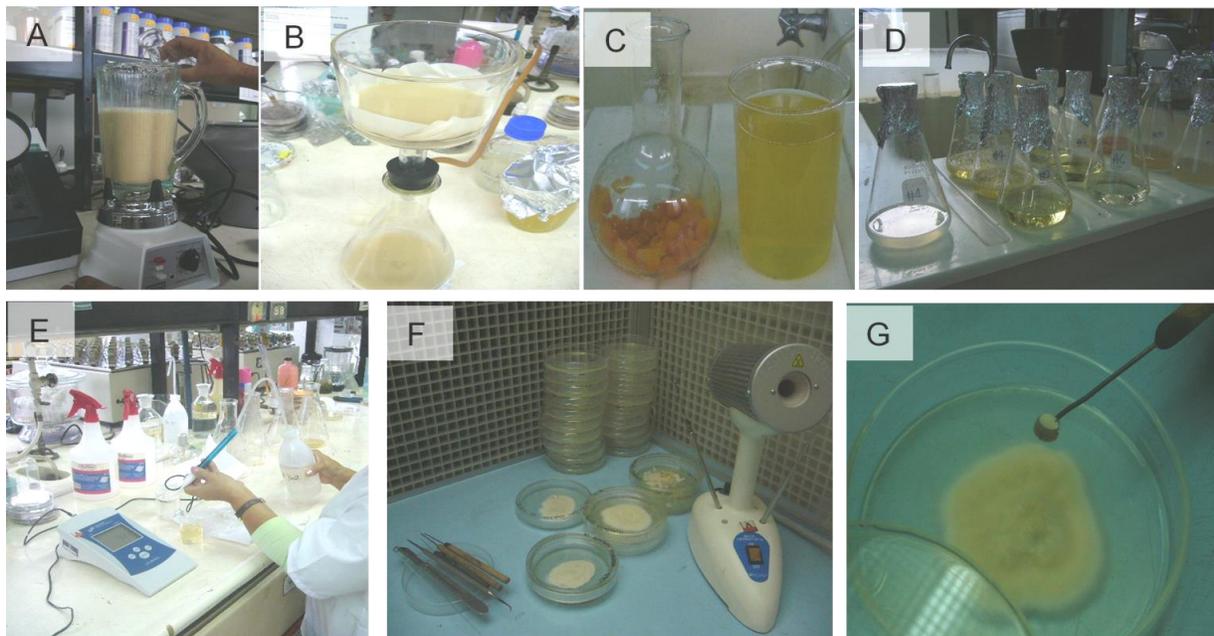
Fuente: Elaboración propia, 2018.

Preparación de medios de cultivo sólidos

Para la preparación de cada uno de los medios de cultivo se realizaron los siguientes pasos generales:

1. Se pesaron los diferentes componentes según correspondiera en cada caso.
2. Se mezclaron los componentes en agua destilada y se disolvieron mediante calentamiento.
3. Se agregó ácido láctico (25% v/v) para ajustar el pH. El pH final para cada uno de los medios se presenta en el anexo 1.
4. Se esterilizaron todos los medios en autoclave por 20 minutos a 15 libras de presión y 121°C.
5. Se dejaron enfriar los medios hasta aproximadamente 25 °C.
6. Se vertieron los medios en platos Petri bajo condiciones asépticas.

Figura 8. Proceso de preparación de los diferentes medios nutritivos. A-D) Mezcla de los diferentes nutrientes. E) Medición de pH. F-G) Platos con hongo purificado listo para hacer las inoculaciones.



Fuente: León, 2018.

Para la elaboración de los medios papa + zanahoria y papa + zanahoria + quitina se preparó un extracto de papa y zanahoria, para esto, las papas y zanahorias se partieron en trocitos y sin pelar se hirvieron por separado en un beaker de 500 mL, luego se licuaron y la mezcla se pasó por un colador de tela de manta para obtener una mezcla homogénea o pastosa (sin grumos). Luego se aforó a 1 L con agua destilada.

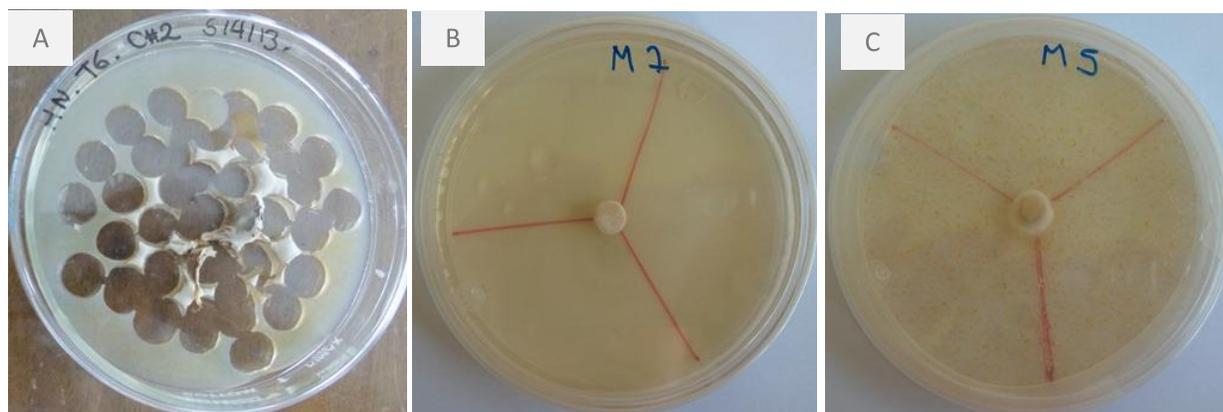
Para la elaboración del medio con jugo de vegetales (V8), este se calentó en baño de maría a 50 °C y se le agregó 0,45 g de CaCO_3 , posteriormente se filtró con tela de manta.

Establecimiento del ensayo de crecimiento de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo sólidos

La cepa de *H. nodulosa* utilizada en este trabajo se aisló a partir de ácaros *S. spinki* infectados, recolectados de la zona de Parrita, Puntarenas en el cultivo de arroz. Para contar con el material fúngico

necesario para los ensayos, *H. nodulosa* se inoculó el hongo en medio H. Para el establecimiento del ensayo, las bases de los platos Petri con los medios de cultivo sólidos se marcaron previamente con tres ejes que en ángulo de 120 grados entre sí, que convergían en el centro del plato (Figura 9). En el punto de convergencia se colocó un bocado circular de 3 mm de diámetro tomado de un cultivo puro (micelio) de *H. nodulosa* (de 10 días de incubación), procurando que el micelio hiciera contacto con el medio. Para cada medio se establecieron seis repeticiones para un total de 72 unidades experimentales. Todos los platos se incubaron a 25 °C por 34 días.

Figura 9. Inoculación de *H. nodulosa* en medios sólidos. A) Cada medio de cultivo fue inoculado con un bocado circular de *H. nodulosa* de 3 mm de diámetro. B-C) Platos marcados con tres ejes en diferentes direcciones conteniendo el bocado circular en el punto de intersección de los ejes.



Fuente: León, 2018.

VARIABLES EVALUADAS

Crecimiento radial

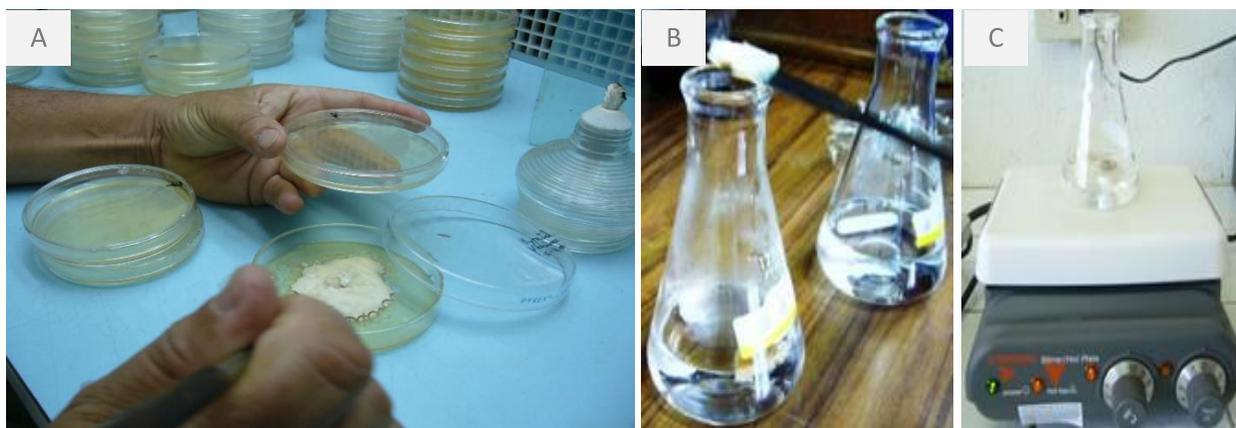
Diariamente se observó el crecimiento radial del hongo en los diferentes medios; sin embargo, la medición de datos se inició a los 17 días de incubación, debido a que el crecimiento fue medible solo en ese momento. A partir de este día se realizaron mediciones a los 20, 27, 30 y 34 días. Las mediciones del crecimiento radial se realizaron con una regla milimétrica con la cual se midió el radio de crecimiento

(en mm) en los tres ejes previamente marcados en las bases de los platos. Posteriormente se calculó el promedio de las tres mediciones debido a que el crecimiento del hongo no siempre fue simétrico.

Producción de conidios

Las colonias resultantes al final del periodo de crecimiento del hongo a los 34 días de incubación, fueron cortadas y colocadas en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de agua destilada con dos gotas de Tween 20 (monolaurato de polietilenglicol sorbitán). Posteriormente los matraces fueron ultrasonificados durante cinco minutos y las suspensiones se agitaron en un agitador de vórtex marca Corning para separar o liberar las conidios (Figura 10).

Figura 10. Cosecha de conidios de Hirsutella nodulosa. A) Raspado del medio. B) Suspensión de material fúngico en agua destilada + Tween 20. C) Agitación de las suspensiones de material fúngico.

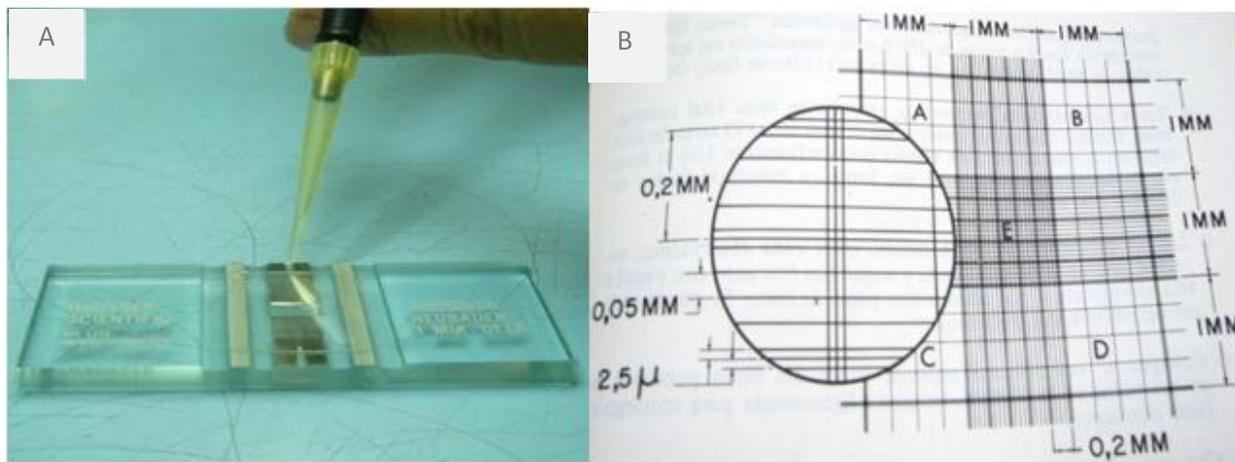


Fuente: León, 2018.

Para determinar el número de conidios contenidos en la suspensión de cada medio de cultivo, se tomaron muestras con pipetas estériles graduada de 100 μL , y se procedió a contar las esporas usando una cámara de Levy con rayado de Neubauer (Figura 11). Para esto se seleccionaron 40 cuadros pequeños de un total de 400 cuadros de $1/400 \text{ mm}^3$, y se estimó la concentración de conidios por mL utilizando la fórmula $N^* 1,0 \times 10^5$ (N^* = cantidad de propágulos). Este valor se multiplicó por el

volumen y dividió por el área de la sección del medio removido del plato Petri. El conteo se realizó por duplicado y se reportó la producción de conidios/g a los 34 días de crecimiento en los medios de cultivo sólidos.

Figura 11. Conteo de esporas de *Hirsutella nodulosa* A) Cámara de Levy. B) Rayado de Neubauer.

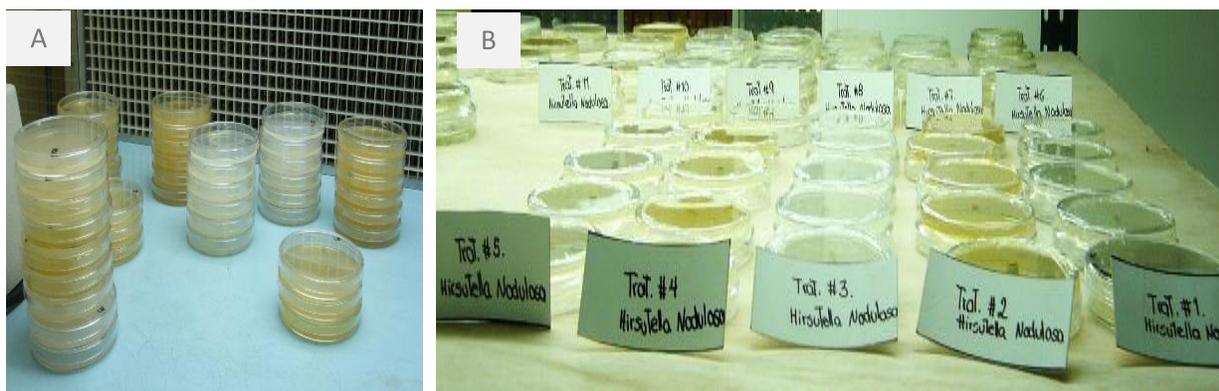


Fuente: León, 2018.

Diseño experimental

Se estableció un diseño en parcelas divididas, donde la parcela principal está dada por el arreglo en forma aleatoria de los diferentes tipos de medios de cultivo y sus repeticiones (Figura 12). Se trató de un diseño factorial con dos factores: 1) tipo de medio de cultivo sólido con 12 niveles: medios de cultivo diferentes, y 2) para el caso del crecimiento radial se realizaron mediciones en el tiempo con cinco niveles: cinco fechas diferentes de medición. Para cada tratamiento se establecieron seis repeticiones (correspondientes a seis platos Petri por cada medio de cultivo).

Figura 12. Estructura de parcelas y subparcelas del ensayo de crecimiento de *Hirsutella nodulosa* en los diferentes medios nutritivos sólidos.



Fuente: León, 2018.

Evaluación de medios líquidos para la producción de propágulos por *Hirsutella nodulosa*

Composición y preparación de los medios de cultivo líquidos

Los medios de cultivo líquidos fueron los mismos evaluados en fase sólida (12 medios diferentes), por lo que la composición y preparación fue la misma descrita para los medios sólidos en el apartado anterior, excluyendo en la preparación el agente solidificante (agar). El ajuste de pH final de los diversos medios se indica en el anexo 2.

Establecimiento del ensayo de crecimiento de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo líquidos

Los medios líquidos se dispensaron en Erlenmeyer de 250 mL, cada matraz contenía 100 mL de medio de cultivo (Figura 13). Cada uno de los matraces fue inoculado con un bocado de medio de cultivo H de 3 mm de diámetro conteniendo crecimiento micelial de *H. nodulosa*. Para cada medio se establecieron seis repeticiones para un total de 72 unidades experimentales. Todos los matraces fueron incubados en un cuarto de crecimiento a 27 °C durante 22 días en un agitador orbital (PS Lab Orbital

Shaker. Model OS 500) a 120 rpm (Figura 14). La producción de propágulos fue evaluada en siete distintas fechas con una separación de tres días entre evaluación, a los 2, 5, 8, 11, 15, 18 y 22 días.

Figura 13. Inoculación de los diferentes medios de cultivo líquidos.



Fuente: León, 2018.

Figura 14. A-B) Producción de propágulos por parte de Hirsutella nodulosa en diferentes medios de cultivo líquidos.



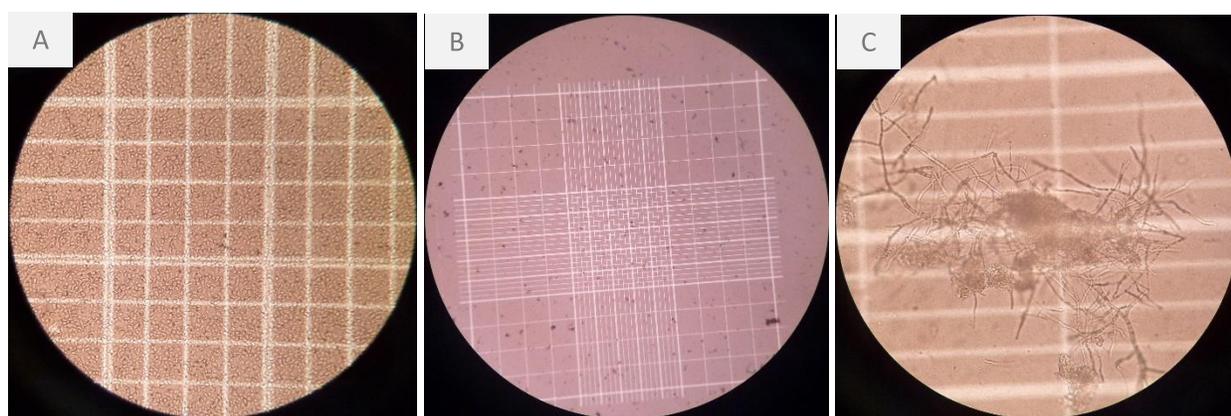
Fuente: León, 2018.

VARIABLES EVALUADAS

Producción de blastosporas

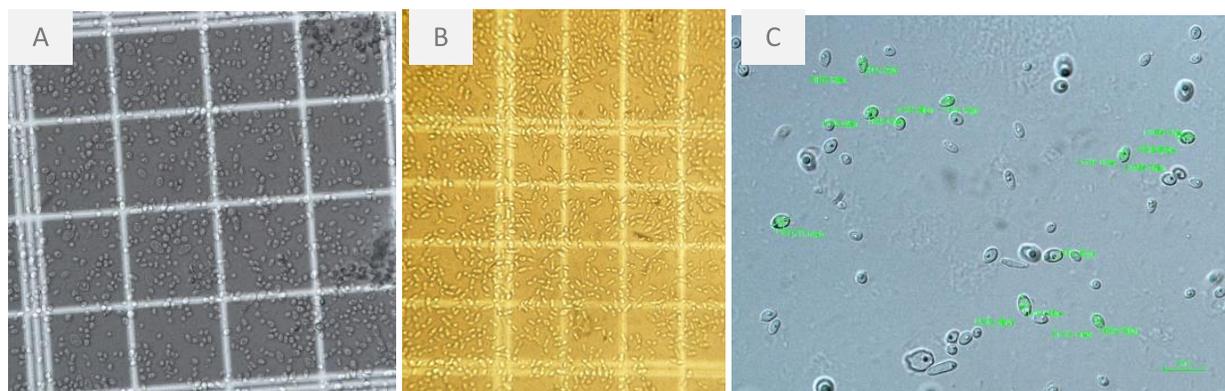
Cada dos días y hasta los 22 días de incubación, se tomaron 100 μ L de cada medio de cultivo, los cuales se colocaron directamente en la cámara de Levy con rayado de Neubauer para realizar el conteo de blastosporas producidas por *H. nodulosa* (Figuras 15-16).

Figura 15. A) Cámara de Neubauer conteniendo la producción de blastosporas en condiciones de agitación orbital producidas en medio H. B) Escasa producción de blastosporas en el tratamiento testigo (agar agua). C) Formación de micelio en medio H.



Fuente: León, 2018.

Figura 16. A-C) Cámara de Neubauer conteniendo blastosporas de *Hirsutella nodulosa* en medio H + quitosano. Tamaño promedio aproximado de las blastosporas es de entre 3,88-7,63 μ m.

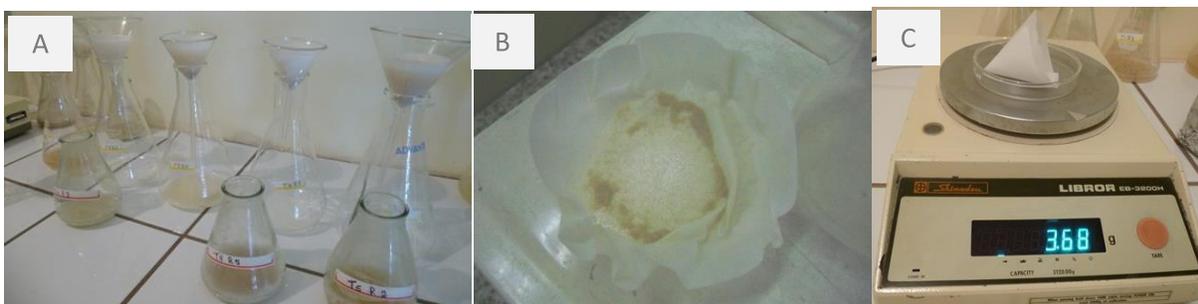


Fuente: León, 2018.

Producción de biomasa

Al finalizar el periodo de incubación de 22 días se procedió a comparar la producción total de biomasa = (micelio + propágulos de *H. nodulosa*). Para separar la biomasa se utilizó la filtración por gravedad en papel Whatman #1. El tiempo de escurrido fue diferente para cada medio de cultivo de acuerdo con la concentración de biomasa en suspensión (Figura 17). El filtrado se secó en una estufa por cinco días a 25 °C y luego se pesó (Figura 18). Posteriormente se pesó un gramo de la bioamasa seca, que fue colocada en 10 mL de agua más una gota de Tween 20 para realizar conteo de conidios en cámara de Levy y obtener el peso seco promedio de biomasa fúngica.

Figura 17. A) Proceso de filtrado. B) Biomasa obtenida luego del filtrado. C) Pesaje de micelio.



Fuente: León, 2018.

Figura 18. Biomasa obtenida de los diferentes tratamientos filtrados con papel de Whatman® y secados en horno a 25°C durante 5 días.



Fuente: León, 2018.

Diseño Experimental

El experimento tuvo un diseño completamente aleatorizado, donde la parcela principal estuvo dada por el arreglo en forma aleatoria de los diferentes tipos de medios de cultivo (matraces Erlenmeyer) y sus repeticiones, y la subparcela estuvo definida por las evaluaciones en el tiempo (Figura 19). Se trató de un experimento factorial con dos factores: 1) tipo de medio de cultivo líquido (con 12 niveles = medios de cultivo diferentes) y 2) mediciones en el tiempo (con cinco niveles = cinco fechas diferentes de medición).

Figura 19. Estructura de parcelas y subparcelas del ensayo de crecimiento de Hirsutella nodulosa en los diferentes medios nutritivos líquidos.



Fuente: León, 2018.

Análisis estadístico

Para determinar la influencia de los tratamientos sobre las variables de respuesta medidas tanto en medios sólidos como líquidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) bajo la teoría de modelos lineales mixtos. El modelo utilizado se describe como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{con: } i = 1 \dots 12, j = 17 \dots 34, k = 1 \dots 6$$

donde

Y_{ijk} : variable de respuesta del i-ésimo tratamiento, j-ésima día después de inoculado (DDI) y el k-ésimo repetición.

μ : media general

α_i : efecto de la i-ésimo tratamiento.

γ_j : efecto de la j-ésima SDT

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de tratamiento y j de tiempo.

ε_{ijk} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante.

Previamente se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Las variables cumplieron con los supuestos de normalidad y para el cumplimiento de la homogeneidad de varianzas se ajustaron las funciones de varianza según los criterios de *Akaike* (AIC) y de información *Bayesiano* (BIC). En las variables donde existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron las comparaciones de medias por medio de la prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ($p \leq 0.05$) permitiendo la formación de grupos excluyentes y no transición entre tratamientos sólidos y líquidos (Anexos 3 y 4).

Producción bifásica de *Hirsutella nodulosa*

Preparación de matrices

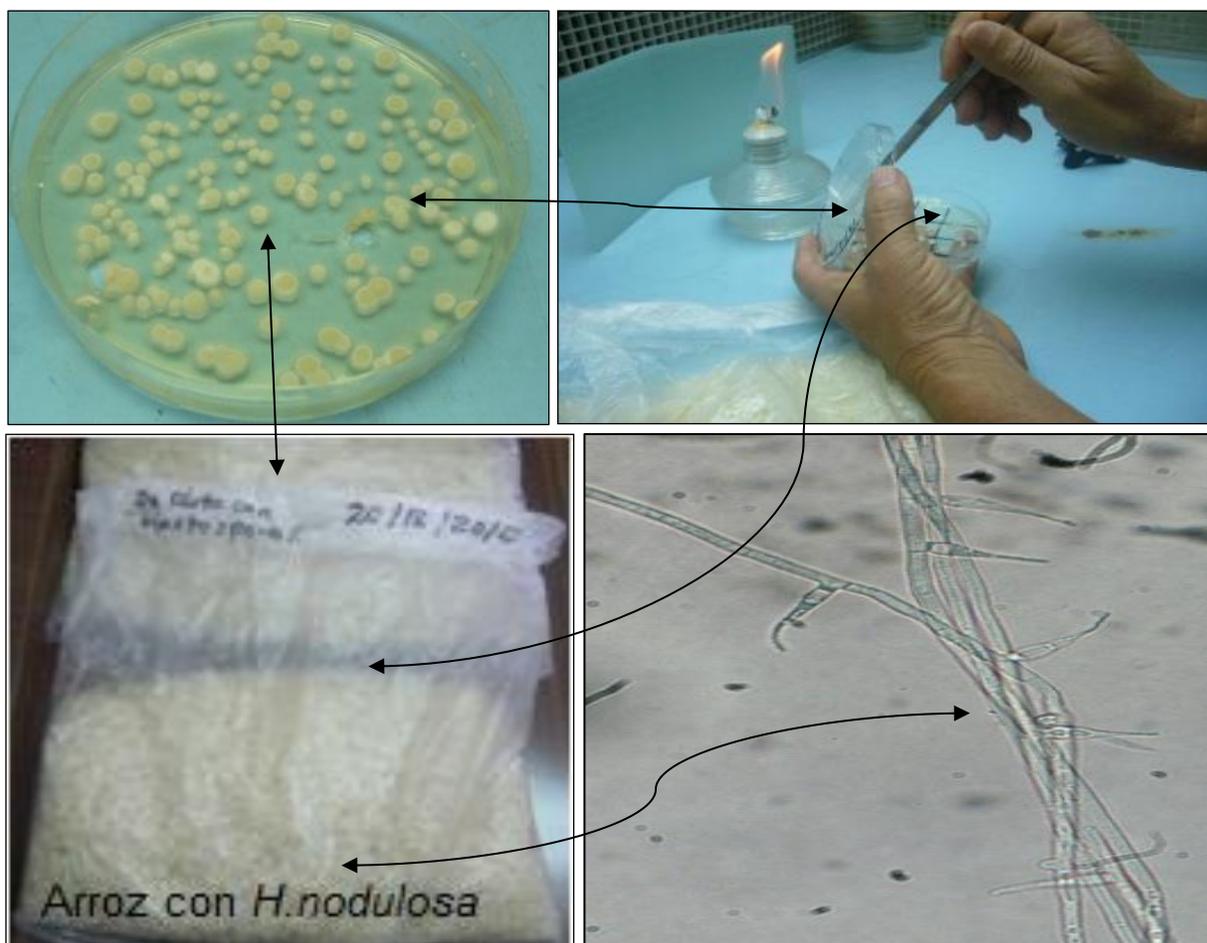
Para realizar la producción bifásica de *H. nodulosa*, se utilizó la metodología descrita por Obregón (2008) (Figuras 20-21). Para ello se colocaron en bolsas de polipropileno 100 g de arroz, y luego se añadieron 30 mL de agua destilada. Las bolsas se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 15 libras de presión y 121 °C. Posterior a la esterilización se sacudieron las bolsas para que el arroz quedara suelto. Luego se dejaron reposando hasta que el arroz se enfrió. Una vez frías las bolsas, se trasladaron a la cámara de flujo laminar, en cada bolsa se colocaron 100 mL de inóculo proveniente de los medios líquidos conteniendo blastosporas a una concentración de $1,3 \times 10^6$ propágulos/mL. Se estableció una matriz bifásica (bolsa) por medio de cultivo evaluado. Todas las bolsas inoculadas se colocaron en la incubadora durante ocho días a una temperatura constante de 26 °C.

Figura 20. Inoculación de blastosporas y micelio de los diferentes medios líquidos en matrices de arroz.



Fuente: León, 2018.

Figura 21. Inoculación de micelio y propágulos de los diferentes medios sólidos en matrices de arroz.



Fuente: León, 2018.

Producción de conidios

A los ocho días de incubación de las matrices de arroz, se tomaron muestras de aproximadamente un gramo para determinar la producción de conidios. Para esto, las muestras fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de agua destilada más una gota de Tween 20® (al 0,1%). Los matraces se ultrasonificaron por cinco minutos y luego fueron agitados en agitador de vórtex durante un minuto para homogenizar. Para el conteo de conidios, se tomaron 10 μL de la suspensión y se colocaron en la cámara de Levy. El conteo se realizó en 40 cuadros de $1/400 \text{ mm}^3$ y para

el cálculo de la concentración de conidios/g de arroz se utilizó la fórmula $N^* 1,0 \times 10^5 \times \text{volumen total}$ (N*= cantidad de propagulos).

Cálculo de la relación costo/beneficio de la producción de *Hirsutella nodulosa* en matrices bifásicas

Se calculó un análisis de los costos de producción para un litro de producto terminado, elaborado a partir de cada uno de los medios evaluados en esta investigación. Se incluyeron los costos por el uso de insumos y por el gasto de recurso humano directo, excluyendo los costos indirectos, los gastos administrativos y el consumo de capital fijo.

Los costos por consumo de insumos se calcularon a partir de las dosis recomendadas en los protocolos del Laboratorio de Fitoprotección del INTA. Asimismo, se estimó el gasto en recurso humano a partir de un estudio de tiempos y movimientos de cada proceso de la preparación de los medios. Se elaboró un estudio de mercado para actualizar los precios de los insumos.

Se fijó el salario del recurso humano en un monto de CRC 370.000,00 equivalente al de un Técnico del Servicio Civil 1, además, a este rubro se le incluyeron provisiones por un 39,82% que incluyen al aporte patronal a la Caja Costarricense de Seguro Social, el aguinaldo y la póliza del Instituto Nacional de Seguros. La inversión total en recurso humano ascendió a un monto de CRC 465.025,94 equivalente a un costo por hora de CRC 2.684,91.

Cada medio en evaluación posee una combinación de diferentes componentes y dosis, por lo tanto, su costo varió. De igual manera, la producción de blastosporas en cada medio varió. Al ser la blastospora el producto final requerido, se consideró la producción de estas estructuras por litro de medio de cultivo como la mejor aproximación a una variable de beneficio. Por lo tanto, el ratio constituido por el costo de un litro de medio dividido por la producción de blastosporas en un litro de medio, fue el indicador de costo-beneficio utilizado para comparar los tratamientos. La rentabilidad de

cada medio líquido se calculó relacionando el costo por litro entre la producción blastosporas (Anexos 5 y 6).

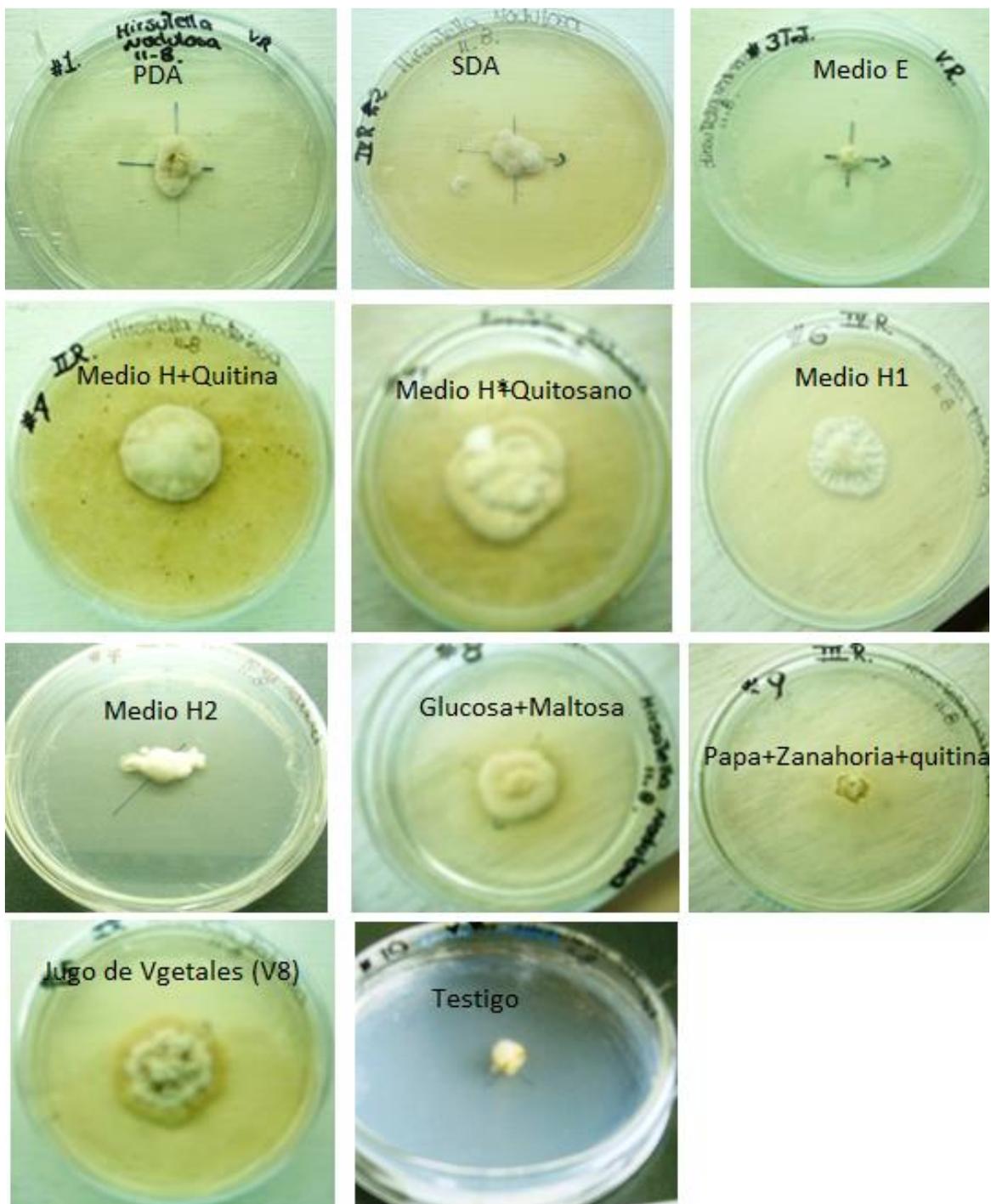
Capítulo IV: Análisis e interpretación de los resultados

Evaluación de medios sólidos para producción de biomasa por *Hirsutella nodulosa*

Crecimiento radial

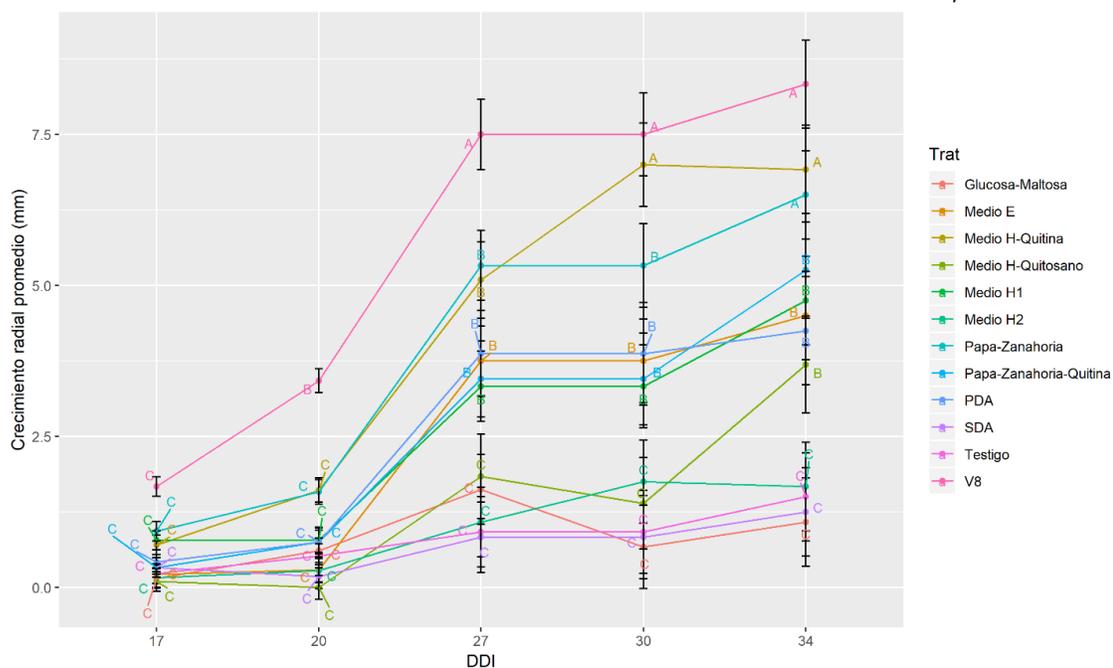
Hirsutella nodulosa presentó diferencias en su crecimiento de acuerdo con el tipo de medio de cultivo utilizado. Estas diferencias fueron evidentes a simple vista (Figura 22). En términos cuantitativos el crecimiento radial fue más rápido en los medios de cultivo: V8 ($8,33 \pm 0,73$ mm) entre los 27 y 34 días, seguido del medio H + quitina ($7,0 \pm 0,69$ mm) entre los 30 y 34 días y medio papa-zanahoria ($6,50 \pm 0,73$ mm) a los 34 días; sin existir diferencias significativas entre estos tres medios (Figura 23). La velocidad de crecimiento en los medios V8, H + quitina y papa + zanahoria fue muy similar al inicio, pero a partir del día 27 el hongo creció más rápidamente en medio V8; sin embargo, para el día 34 el hongo presentó un crecimiento promedio similar (Figura 23; Tabla 3). En el resto de los medios, el crecimiento del hongo fue más lento, presentando en algunos casos diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre estos y con el testigo (medio agar agua).

Figura 22. Crecimiento radial de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo sólidos a los 27 días de incubación.



Fuente: León, 2018.

Figura 23. Curvas de crecimiento radial de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivos sólidos. DDI = Días después de inoculados



Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($P \leq 0,05$).

Fuente: León, 2018.

Tabla 3. Crecimiento radial promedio de *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo sólidos, incubados en cámara bioclimática.

Tratamiento	Crecimiento promedio (mm) en días					$\bar{x}_{\text{crecimiento}}$
	17	20	27	30	34	
PDA	0,42 c	0,75 c	3,87 b	3,75 b	4,25 b	2,61
SDA	0,33 c	0,18 c	0,83 c	0,83 c	1,25 c	0,68
Medio E	0,22 c	0,29 c	3,75 b	3,75 b	4,50 b	2,50
Medio H + quitina	0,70 c	1,61 c	5,09 b	7,0 a	6,92 a	4,26
Medio H + quitosano	0,10 c	0,0 c	1,84 c	1,39 c	3,69 b	1,40
Medio H1	0,78 c	0,78 c	3,33 b	3,33 b	4,75 b	2,59
Medio H2	0,16 c	0,28 c	1,08 c	1,75 c	1,67 c	0,99
Glucosa + maltosa	0,15 c	0,61 c	1,62 c	0,67 c	1,08 c	0,83
Papa + zanahoria	0,93 c	1,58 c	5,33 b	5,33 b	6,50 a	3,93
Papa + zanahoria + quitina	0,33 c	0,75 c	3,45 b	3,45	5,25 b	2,65
Jugo de vegetales (V8)	1,67 c	3,42 b	7,50 a	7,50 a	8,33 a	5,68
Testigo (agar agua)	0,23 c	0,52 c	0,92 c	0,92 c	1,50 c	2,61

Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre medias.

Condiciones de incubación: $26 \pm 3^\circ\text{C}$, $43 \pm 5\%$ HR, y fotoperiodo de 12 horas de luz.

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El mayor crecimiento radial promedio diario se alcanzó en los medios V8 con 0,84 mm/día (Figura 24), seguido de medio H + quitina con 0,63 mm/día y medio papa zanahoria con 0,58 mm/día. Los resultados indicaron que el crecimiento del hongo es favorecido por el aporte nutrimental del jugo de vegetales (tomate natural, zanahoria, espinaca, lechuga, betabel, apio, berro y perejil), el cual consiste en 4 g de hidratos de carbono, 380 mg de sodio, 171 µg de vitamina A, además proporciona vitamina C, y minerales como: fósforo, magnesio, hierro y zinc. En el resto de los medios *H. nodulosa* creció más lentamente a razón de 0,12 a 0,38 mm/día.

Figura 24. A) Preparación de medio de cultivo con jugo de vegetales (V8). B-C) Crecimiento del hongo *Hirsutella nodulosa* en el medio V8.



Fuente: León, 2018.

Producción de conidios

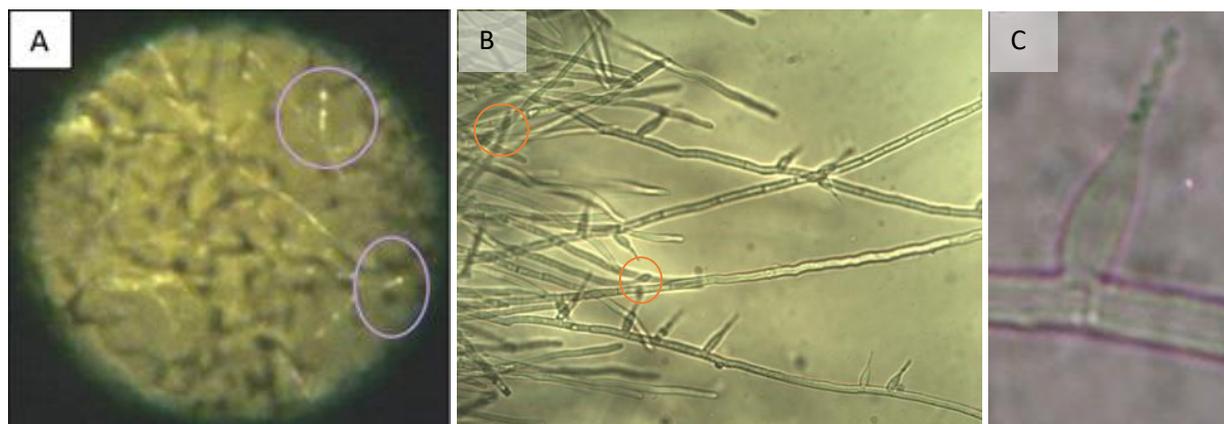
Los medios de cultivo donde *H. nodulosa* que produjeron la mayor cantidad de conidios después de los 22 días de incubación, fueron: medio H + quitosano con $3,19 \times 10^7$ conidios/mL, seguido de papa + zanahoria + quitina con $3,0 \times 10^6$ conidios/mL, PDA con $2,4 \times 10^6$ conidios/mL, medio H, medio H + quitina con $1,3 \times 10^6$ conidios/mL y por último los medios H1, H2, glucosa + maltosa y papa +zanahoria con $1,6 \times 10^6$ conidios/mL (Tabla 4; Figura 25).

Tabla 4. Producción de conidios por *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo sólidos.

Medio de cultivo	Número de conidios/mL
PDA	$2,4 \times 10^6$
SDA	$8,0 \times 10^5$
Medio E	$1,0 \times 10^5$
Medio H + quitina	$1,3 \times 10^6$
Medio H + quitosano	$3,2 \times 10^7$
Medio H1	$1,0 \times 10^6$
Medio H2	$1,0 \times 10^6$
Glucosa + -maltosa	$1,0 \times 10^6$
Papa + zanahoria	$1,0 \times 10^6$
Papa + zanahoria + quitina	$3,0 \times 10^6$
Jugo de vegetales (V8)	$8,0 \times 10^5$
Testigo (agar-agua)	$1,3 \times 10^3$

Fuente: elaboración propia, 2018.

Figura 25. Estructuras de *Hirsutella nodulosa* A) En círculo fiálides del hongo, con forma de cabeza de fósforo encendido. B) Micelio y fiálides obsérvese los conidios adherida a la fiálides. C) Fiálides sin conidio curvado con cuello sinuoso.



Fuente: León, 2021.

De acuerdo con los resultados, la producción de conidios fue favorecida por la incorporación de quitina y quitosano en los medios de cultivo, ya que se estimuló el crecimiento micelial y la esporulación de *H. nodulosa*. Es probable que el quitosano aumentara la adhesión celular del hongo ya que las células se adhieren fuertemente y proliferan adecuadamente (Sánchez, 2006) (en comparación con la quitina), esto debido a que el quitosano es más soluble que la quitina, favoreciendo la reproducción del

hongo. El quitosano es un tipo de fibra procesada químicamente de los caparazones de los crustáceos y se deriva de la quitina mediante un proceso de desacetilación química o enzimática (Lárez, 2003).

En general, *H. nodulosa* produjo una baja cantidad de conidios (en comparación con otros hongos). En métodos de control biológico se recomienda que el agente microbiano sea usado en concentraciones del orden de $1,0 \times 10^6$ conidios/mL o de 50 g/L de micelio (Rosas y Sampedro, 2006), en caso de una baja producción de conidios. En este ensayo la concentración mínima deseada fue superada cuando el hongo creció en medio H + quitosano, donde se produjeron $3,2 \times 10^7$ conidios/mL, así como el medio papa + zanahoria + quitina con $3,0 \times 10^6$ conidios/mL, en PDA con $2,4 \times 10^6$ conidios/mL y en medio H + quitina con $1,3 \times 10^6$ conidios/mL. En general esta cantidad mínima de conidios se produjo en todos los medios excepto en SDA, medio E y medio V8.

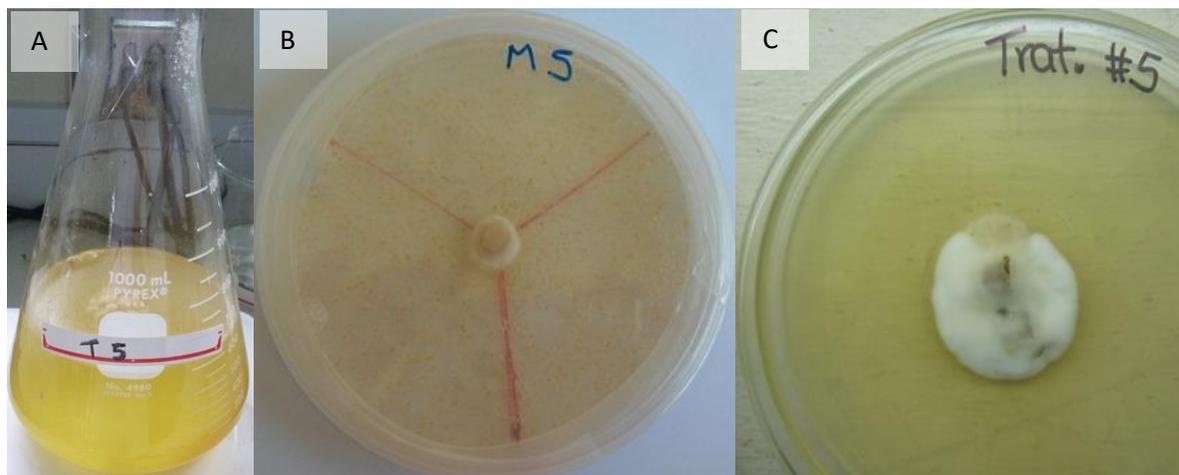
Relación entre producción de conidios y micelio por *Hirsutella nodulosa*

La concentración de conidios no fue proporcional a la producción de biomasa (Tabla 5). Por ejemplo, la producción de conidios en medio H + quitosano fue alta ($3,2 \times 10^7$ conidios /mL), mientras que la producción de biomasa fue intermedia ($1,54 \pm 0,01$ g). Esto indica que, en este medio el hongo de *H. nodulosa*, invirtió mayores recursos en la producción de conidios en comparación con la producción de biomasa, posiblemente como estrategia de supervivencia (Figura 26). Por otro lado, en medios como el SDA y V8, la biomasa producida fue mayor, pero no la producción de conidios. En el medio de V8 se obtuvo una menor cantidad de conidios, en comparación con otros medios; sin embargo, la biomasa producida duplicó la obtenida en el medio H + quitosano.

Tabla 5. Producción de conidios y micelio por *Hirsutella nodulosa* en diferentes medios de cultivo sólidos.

Medio de cultivo	Número de conidios/mL	Micelio (Peso seco en g)
PDA	$2,4 \times 10^6$	$2,83 \pm 0,74$
SDA	$8,0 \times 10^5$	$0,26 \pm 0,06$
Medio E	$1,0 \times 10^6$	$1,36 \pm 0,12$
Medio H + quitina	$1,3 \times 10^6$	$2,53 \pm 0,00$
Medio H + quitosano	$3,2 \times 10^7$	$1,54 \pm 0,01$
Medio H1	$1,0 \times 10^6$	$1,14 \pm 0,04$
Medio H2	$1,0 \times 10^6$	$1,24 \pm 0,03$
Glucosa + maltosa	$1,0 \times 10^6$	$1,58 \pm 0,11$
Papa + zanahoria	$1,0 \times 10^6$	$1,31 \pm 0,09$
Papa + zanahoria+ quitina	$1,0 \times 10^6$	$1,20 \pm 0,04$
Jugo de vegetales (V8)	$8,0 \times 10^5$	$2,05 \pm 0,73$
Testigo (agar-agua)	$5,0 \times 10^4$	$0,03 \pm 0,01$

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Figura 26. A) Preparado del medio H + quitosano. B-C) Crecimiento del hongo *Hirsutella nodulosa* en el medio H + quitosano.

Fuente: León, 2018.

La adición de quitina y quitosano en los medios H y papa zanahoria parecen influir de manera importante en la alta producción de conidios. Ambas sustancias son polisacáridos y la quitina está presente en el exoesqueleto de diversos artrópodos incluyendo insectos y ácaros, y puede constituir una fuente de carbono asimilable para *H. nodulosa*. Es importante considerar que el carbono representa el 50% de la biomasa producida en las fermentaciones (Chong, 2003), por tal motivo es el nutriente de

mayor concentración en un medio de cultivo; sin embargo, no todos los microorganismos reaccionan igual al tipo de fuente de carbono, ya que los requerimientos nutricionales de los microorganismos varían. De ahí que, para la producción de hongos entomopatógenos se han utilizado medios de cultivo con diversas fuentes de carbono: como glucosa (Chong, 2003; Bidochka, *et al.*, 1987; Thomas, *et al.*, 1987; Humphrey, *et al.*, 1989), maltosa (Rombach, 1989), sacarosa (Rombach, *et al.*, 1988; Samsináková, 1966), o quitina (Hegedus, *et al.*, 1990). También pueden ser necesarias algunas vitaminas y otras sustancias que se hallan presentes en los materiales naturales o artificiales que componen los medios (Ríos, *et al.*, 2008; Curvelo y Rojas, 2010).

Evaluación de medios líquidos para la producción de propágulos por *Hirsutella nodulosa*

Producción de blastosporas

En todos los medios de cultivo probados se produjeron blastosporas, cuyas concentraciones difirieron estadísticamente con respecto al testigo absoluto constituido por el medio agar agua. La producción de blastosporas por *H. nodulosa* fue variable de acuerdo con el medio de cultivo en el que creció y el tiempo de incubación. En general el hongo produjo mayor cantidad de blastosporas en los medios: medio E, medio H + quitina, medio H + quitosano, medio H1, medio H2 y glucosa + maltosa (Tabla 6). En estos medios se presentaron picos de producción entre los 2 y los 15 días. Los picos de producción de blastosporas fueron más evidentes en el medio E y los medios H. En los medios PDA y papa zanahoria, *H. nodulosa* produjo una cantidad intermedia de blastosporas por mL de medio de cultivo. La producción de blastosporas en el resto de los medios de cultivo fue más o menos constante con producciones menores de esporas (Figura 27, Anexo 7).

En seis de los medios de cultivo: (medio E, medio H + quitina, medio H + quitosano, medio H1, medio H2 y medio glucosa + maltosa), *H. nodulosa* produjo en promedio 10^7 blastosporas/mL entre los

dos y los 15 días de incubación, teniendo la máxima producción de blastosporas en el día 11 después de la inoculación (Tabla 6; Figura 28). El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la producción de blastosporas; específicamente la interacción medio de cultivo \times tiempo de incubación fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la producción de blastosporas en los medios E, H + quitosano, H1, H2 y medio maltosa + glucosa no difirieron estadísticamente entre sí, ni con los medios PDA, H + quitina, papa + zanahoria, papa + zanahoria + quitosano, jugo de vegetales V8 ni con el testigo absoluto.

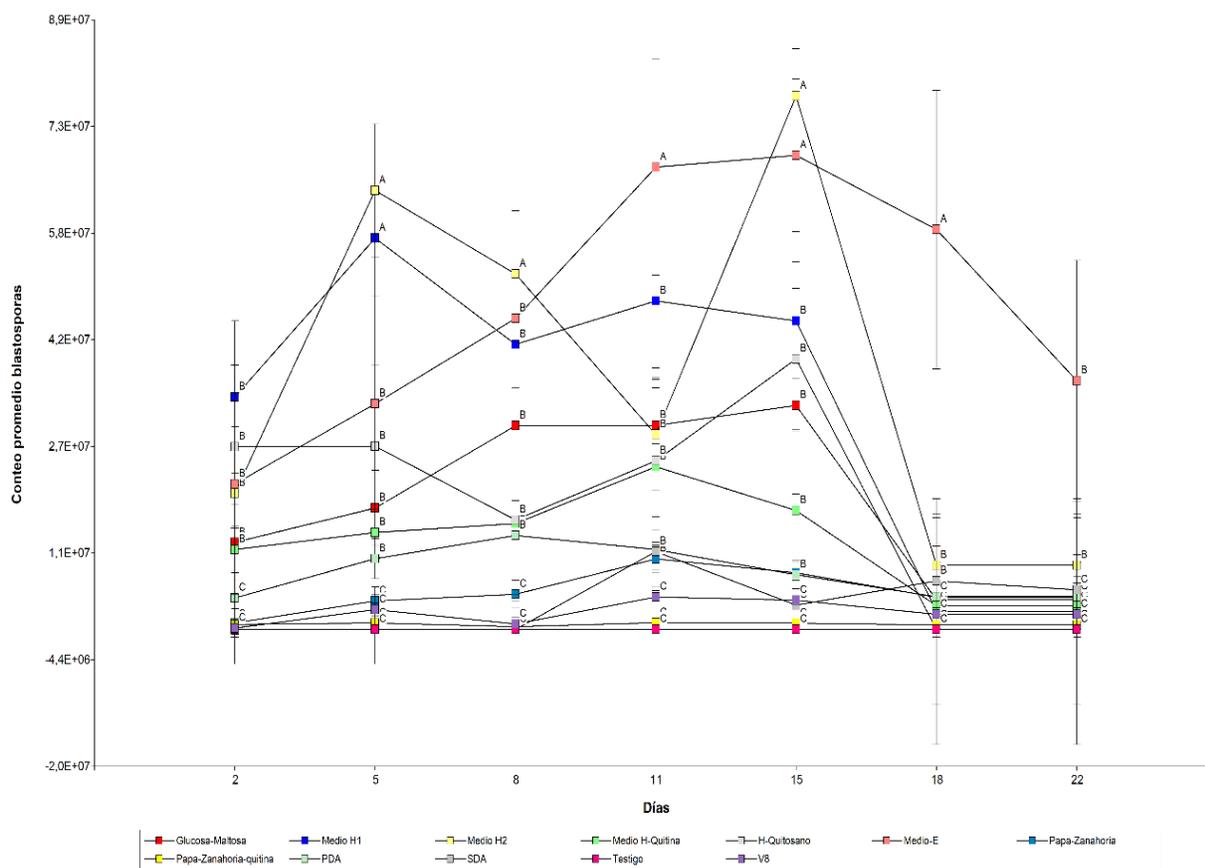
Tabla 6. Producción de blastosporas del hongo *Hirsutella nodulosa* en medios de cultivo líquidos, incubados en cámara bioclimática (26°C, 5% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas luz).

Medio de cultivo	Producción promedio (blastosporas/mL) en días							\bar{x}
	2 días	5 días	8 días	11 días	15 días	18 días	22 días	
PDA	4,5X10 ⁶ c	1,0X10 ⁷ b	1,3X10 ⁷ b	1,1X10 ⁷ b	7,9X10 ⁶ b	4,7X10 ⁶ c	4,7X10 ⁶ c	8,20X10 ⁶
SDA	1,9X10 ⁻⁰⁹ c	3,0X10 ⁻⁰⁹ c	2,4X10 ⁻⁰⁸ c	1,1X10 ⁷ b	3,5X10 ⁶ c	7,0X10 ⁶ b	5,7X10 ⁶ c	3,90X10 ⁶
Medio E	2,1X10 ⁷ b	3,2X10 ⁷ b	4,5X10 ⁷ b	6,7X10 ⁷ a	6,9X10 ⁷ a	5,8X10 ⁷ a	3,6X10 ⁷ b	4,70x10 ⁷
Medio H + quitina	1,1X10 ⁷ b	1,4X10 ⁷ b	1,5X10 ⁷ b	2,3X10 ⁷ b	1,7X10 ⁷ b	3,4 X10 ⁶ c	3,4 X10 ⁶ c	1,20x10 ⁷
Medio H + quitosano	2,6X10 ⁷ b	2,6X10 ⁷ b	1,5X10 ⁷ b	2,4X10 ⁷ b	3,9X10 ⁷ b	4,2X10 ⁻¹ c	4,2X10 ⁻¹ c	1,90X10 ⁷
Medio H1	3,3X10 ⁷ b	5,7X10 ⁷ a	4,1X10 ⁷ b	4,7X10 ⁷ b	4,5X10 ⁷ b	2,6X10 ⁶ c	2,6X10 ⁶ c	3,20X10 ⁷
Medio H2	1,9X10 ⁷ b	6,4X10 ⁷ a	5,1X10 ⁷ a	2,11X10 ⁷ b	7,7X10 ⁷ a	9,3X10 ⁶ b	9,3X10 ⁶ b	3,70X10 ⁷
Glucosa + maltosa	1,2X10 ⁷ b	1,7X10 ⁷ b	2,9X10 ⁷ b	2,9X10 ⁷ b	3,2X10 ⁷ b	4,3X10 ⁶ c	4,3X10 ⁶ c	1,80X10 ⁷
Papa + zanahoria	9,3X10 ⁵ c	4,1X10 ⁶ c	5,1X10 ⁶ c	1,0X10 ⁷ b	8,2X10 ⁶ b	4,6X10 ⁶ c	4,6X10 ⁶ c	5,40X10 ⁶
Papa + zanahoria + quitina	7,0X10 ⁵ c	9,5X10 ⁵ c	4,0X10 ⁵ c	9,7X10 ⁵ c	9,0X10 ⁵ c	6,5X10 ⁵ c	6,5X10 ⁵ c	7,40X10 ⁵
Jugo de vegetales (V8)	1,8X10 ⁵ c	2,8X10 ⁶ c	8,0X10 ⁵ c	4,7X10 ⁶ c	4,2X10 ⁶ c	2,2X10 ⁶ c	2,2X10 ⁶ c	2,46x10 ⁶
Testigo (agar agua)	5,2X10 ⁻⁰⁸ c	-1,1X10 ⁻⁰⁸ c	8,3X10 ³ c	8,3X10 ³ c	1,5X10 ⁻⁰⁸ c	-4,5X10 ⁻⁰⁸ c	7,8X10 ⁻⁰⁸ c	2,38X10 ³

Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Figura 27. Curvas de producción de blastosporas (por ml) de *Hirsutella nodulosa* en el tiempo, utilizando diferentes medios líquidos.



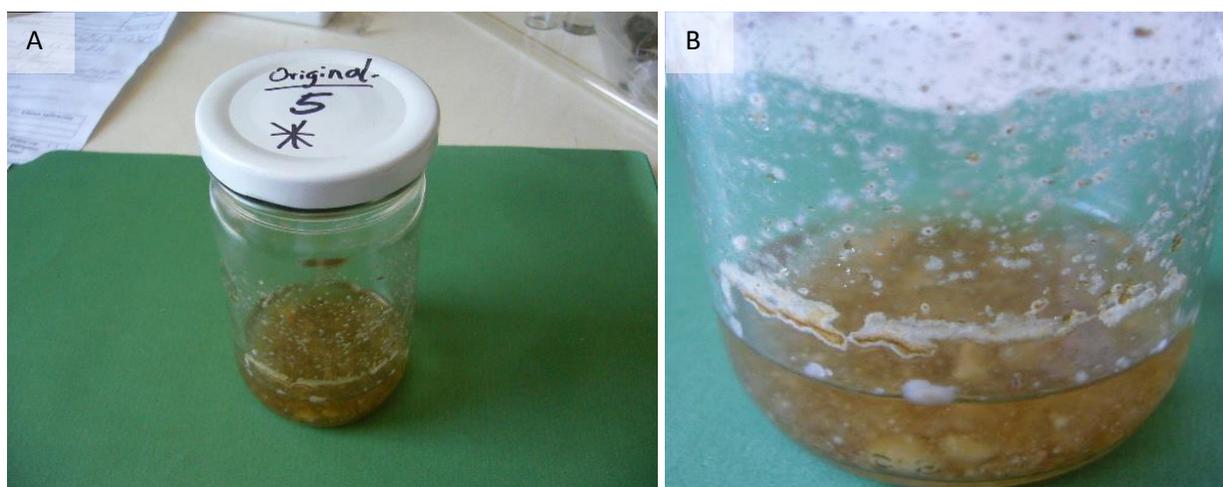
Fuente: León, 2018.

En el medio H + quitosano, *H. nodulosa* produjo una cantidad constante de blastosporas. En este medio las blastosporas pueden permanecer unidas y formar cadenas alcanzando concentraciones de $3,9 \times 10^7$ blastosporas/mL en un periodo de 15 días.

En general las blastosporas presentaron variación en tamaño en un mismo medio de cultivo, pero no se produce un cambio radical en la morfología al cambiar de medio de cultivo. Los medios de cultivo que contienen azúcares puros, tales como sacarosa y dextrosa han sido reportados como propulsores de la formación de blastosporas (Eyal, *et al.*, 1994). Por otro lado, los medios que no tienen azúcares agregados en su formulación estimulan en menor grado la producción de blastosporas (Tabla

6). En pruebas anteriores a este estudio se evidenció que el tipo de quitosano utilizado en el medio de cultivo influye positivamente en la producción de blastosporas. El quitosano elaborado a base de escamas u hojuelas del camarón *Heterocarpus vicarius* funciona mejor al estimular la producción de blastosporas por *H. nodulosa*. En el medio que contiene este componente, se produjo una concentración de $2,6 \times 10^7$ blastosporas/mL en 24 h y con blastosporas limpias y más vigorosas (Figura 28) (León y Avilés, 2009).

Figura 28. A) Producción de blastosporas en condiciones de agitación orbital en medio líquido H + quitosano. B) Formación de micelio del medio líquido H + quitosano.



Fuente: León, 2018.

Hirsutella nodulosa produjo $1,3 \times 10^7$ blastosporas/mL en medio PDA y alcanzó su máximo crecimiento entre los cinco y ocho días de incubación. Mientras que el hongo crecido en el medio SDA alcanzó su máxima producción de $1,1 \times 10^7$ blastosporas/mL en el día 11. Este comportamiento también se observó para los medios E, H + quitina, H + quitosano, medio H1, medio H2, medio glucosa + maltosa y el medio papa + zanahoria con producciones máximas de $6,9 \times 10^7$, $2,3 \times 10^7$, $3,9 \times 10^7$, $5,7 \times 10^7$, $7,7 \times 10^7$, $3,2 \times 10^7$ y $1,0 \times 10^7$ blastosporas/mL respectivamente, el resto de los medios se mantuvieron por debajo de esta producción (Tabla 6).

En algunos de los medios, *H. nodulosa* comenzó a producir micelio desde el día 11, pero en la mayoría de los medios de cultivo lo hizo luego de los 15 días, momento que coincide con la disminución de la producción de blastosporas (Figura 28).

Producción de biomasa

El desarrollo de biomasa (micelio + propágulos) de *H. nodulosa* pudo ser observado en todos los medios de cultivo líquidos; no obstante, se dieron diferencias en la cantidad de biomasa producida en los diversos medios entre los tratamientos (Tabla 7). La mayor producción de biomasa se observó en el medio PDA con 2,83 g/mL, seguida por el medio H + quitina con 2,53 g/mL. La menor producción de micelio fue observada en el testigo con 0,03 g/mL, seguida del medio SDA con 0,26 g/mL. El resto de los medios mostraron una producción de entre 1,14 y 2,06 g/mL (Tabla 7, Anexo 8).

Tabla 7. Biomasa seca producida por Hirsutella nodulosa en medios de cultivo líquidos.

Medio de cultivo	Biomasa promedio (g/mL)*
PDA	2,83 ± 0,74
SDA	0,26 ± 0,06
Medio E	1,36 ± 0,12
Medio H + quitina	2,53 ± 0,00
Medio H + quitosano	1,54 ± 0,01
Medio H1	1,14 ± 0,04
Medio H2	1,24 ± 0,03
Glucosa + maltosa	1,58 ± 0,11
Papa + zanahoria	1,31 ± 0,09
Papa + zanahoria+ quitina	1,20 ± 0,04
Jugo de vegetales (V8)	2,05 ± 0,73
Testigo (agar agua)	0,03 ± 0,01

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Nota: *Estos datos se analizaron para indicar la precisión de una aproximación, el intervalo de confianza, la desviación estándar, o el error en una medida.

Tabla 8. Producción promedio (blastosporas/mL) y producción de biomasa (micelio) de *Hirsutella nodulosa* en diferentes medios de cultivo líquidos.

Medio de cultivo	Número de blastosporas/mL	Biomasa (Peso seco en g)
PDA	$8,20 \times 10^6$	$2,83 \pm 0,74$
SDA	$3,90 \times 10^6$	$0,26 \pm 0,06$
Medio E	$4,70 \times 10^7$	$1,36 \pm 0,12$
Medio H + quitina	$1,20 \times 10^7$	$2,53 \pm 0,00$
Medio H + quitosano	$1,90 \times 10^7$	$1,54 \pm 0,01$
Medio H1	$3,20 \times 10^7$	$1,14 \pm 0,04$
Medio H2	$3,70 \times 10^7$	$1,24 \pm 0,03$
Glucosa + maltosa	$1,80 \times 10^7$	$1,58 \pm 0,11$
Papa + zanahoria	$5,40 \times 10^6$	$1,31 \pm 0,09$
Papa + zanahoria+ quitina	$7,40 \times 10^5$	$1,20 \pm 0,04$
Jugo de vegetales (V8)	$2,46 \times 10^6$	$2,05 \pm 0,73$
Testigo (agar-agua)	$2,38 \times 10^3$	$0,03 \pm 0,01$

Fuente: Elaboración propia, 2018.

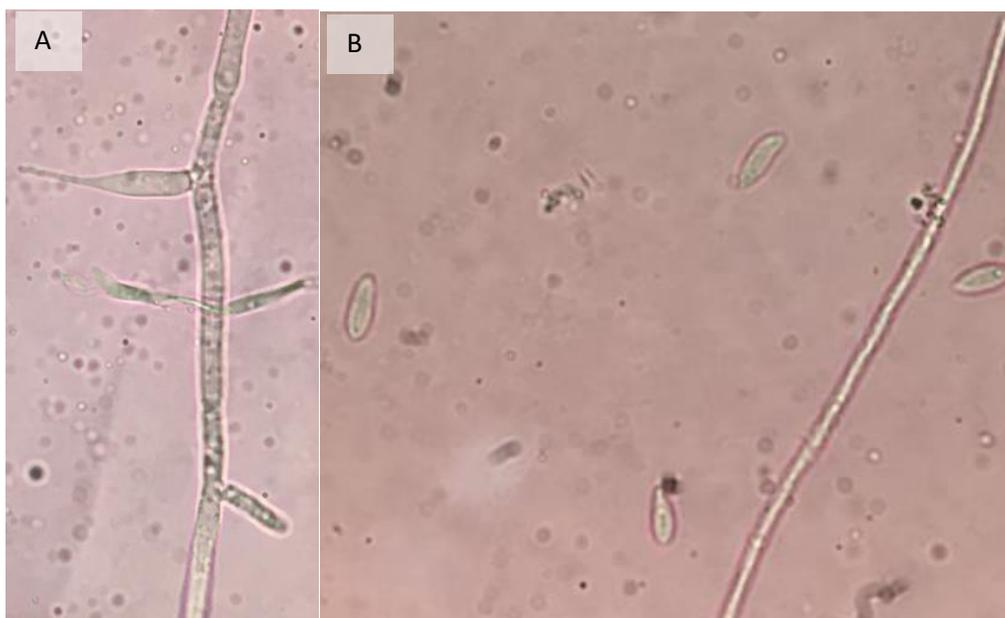
Investigaciones previas han revelado que el tipo de azúcar que se incorpora en el medio de cultivo donde se reproduce *H. nodulosa* tiene una fuerte influencia en el tipo y cantidad de estructuras (micelio y/o propágulos) que produce el hongo. Por esta razón, investigaciones como esta aportan información sobre rutas a seguir para la producción de agentes de control biológico necesarios en la agricultura.

Producción bifásica de *Hirsutella nodulosa*

Producción de conidios

En general las blastosporas de *H. nodulosa* producidas en todos los medios líquidos probados colonizaron las matrices de arroz y produjeron las estructuras típicas del hongo (micelio, fiálides, conidios) (Figuras 29).

Figura 29. Estructuras de *Hirsutella nodulosa* producidas en matrices de arroz: A) micelio y fiálides, B) conidios.



Fuente: León, 2021.

No se observaron diferencias en la velocidad de la colonización del arroz una vez inoculado con los propágulos producidos en los diferentes medios líquidos. La producción de conidios por gramo de arroz mostró ser diferente en función del medio líquido de dónde provenía el inóculo. Se obtuvo una mayor producción cuando el inóculo provino del medio glucosa + maltosa con una producción final de 169,5 conidios/g, seguido por PDA con 137 conidios/g, luego el medio E con 70,5 conidios/g. Los tratamientos con menores conteos de conidios fueron el inoculado con blastosporas producidas en medio jugo de vegetales (V8) con 7,5 conidios/g, agar agua (testigo) con 10 conidios/g, y el medio de cultivo papa + zanahoria con 21 conidios/g (Tabla 9).

Tabla 9. Conteo de conidios producidos en matrices de arroz inoculadas con blastosporas producidas en diversos medios de cultivo líquidos.

Medio líquido Fuente de inóculo	Producción promedio de conidios/g de arroz	Producción de biomasa (Peso seco promedio de biomasa fúngica) (g/mL)
PDA	137	0,093
SDA	70,5	0,132
Medio E	50,5	0,056
Medio H + quitina	31	0,035
Medio H + quitosano	29	0,008
Medio H1	40,5	0,041
Medio H2	169,5	0,045
Glucosa + maltosa	21	0,070
Papa + zanahoria	22	0,012
Papa + zanahoria+ quitina	7,5	0,230
Jugo de vegetales (V8)	10	0,031
Testigo (agar-agua)		

Fuente: elaboración propia, 2018.

La matriz de arroz inoculada con blastosporas producidas en el medio H + quitosano mostró abundante esporulación del hongo en su fase conidial, mediante la producción de fiálides y conidios típicos de *H. nodulosa* (León y Vargas, 2011).

En cuanto al peso seco de la biomasa fúngica producido en el resto de las matrices de arroz, se produjeron 0,23 g/mL cuando el inóculo provino de medio con jugo de vegetales (V8), seguido por 0,13 y 0,09 g/mL (peso seco) cuando el inóculo provino de medio E y PDA respectivamente (Tabla 8). Esto evidencia diferencias substanciales asociadas al medio donde se produce el inóculo para la producción semilla de *H. nodulosa*.

Los resultados de este estudio sugieren que la mejor estrategia para la producción de *H. nodulosa* es utilizar un sistema bifásico que incorpore la producción en medio líquido H + quitosano, seguido de la inoculación en arroz como matriz sólida. Este proceso puede completarse entre 10 y 15 días. Además, en los medios H, el hongo produce una cantidad máxima de estructuras fúngica y tienen

bajo riesgo de contaminación. En otros medios como el V8, *H. nodulosa* produce una cantidad aceptable de estructuras fúngicas pero su consistencia (es un medio muy opaco, que dificulta el conteo de blastosporas) hace difícil el monitoreo y demostró ser más propenso a contaminarse. Más investigación para superar las limitaciones observadas con el medio V8 debe ser considerada debido al potencial que tiene para aumentar la producción de blastosporas.

Con este estudio se comprueba que la manipulación de los parámetros nutricionales donde se reproduce *H. nodulosa*, pueden ser explotados en favor de una mayor producción de blastosporas, micelio y conidios, y se comprueba la factibilidad de producir un medio de cultivo para la producción de biomasa y estructuras infectivas de este hongo acaropatógeno (Anexo 9).

Relación costo/beneficio

Para la elección del medio de cultivo a utilizar para la producción de *H. nodulosa* se debe tomar en cuenta el rendimiento en cuanto a la producción de los propágulos deseados, ya sean conidios, blastosporas o micelio, y otros factores como el costo y la disponibilidad. En la tabla 9 se muestran los costos por litro de cada medio de cultivo líquido y sólido utilizados en el presente estudio. En cuanto a los medios líquidos los más costosos son el medio de cultivo papa + zanahoria + quitina, seguido del medio H + quitina con un costo de ₡11.643,70 por litro y el medio glucosa + maltosa con ₡11.036,04 por litro. Los demás medios de cultivo rondaron los costos entre ₡4.959,65 y ₡7.236,55 colones.

En cuanto a los medios sólidos el más caro con un costo de ₡18.144,35 por litro, fue el medio de cultivo papa + zanahoria + quitina, seguido por el medio glucosa + maltosa con un costo de ₡15.088,50, y el medio H + quitina con un costo de ₡14.872,85. El costo de los medios restantes osciló entre ₡8.005,69 y ₡9.807,09 por litro (Tabla 10).

Tabla 10. Costos de los medios de cultivo evaluados. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021.

Tratamiento	Costo/litro (₡)	
	Medios Líquidos	Medios Sólidos
1 PDA	4 959,65	8 155,57
2 SDA	5 977,65	9 173,57
3 Medio E	5 482,59	9 203,74
4 Medio H + quitina	11 643,70	14 872,85
5 Medio H + quitosano	5 793,70	9 022,85
6 Medio H1	5 150,10	6 509,64
7 Medio H2	5 745,53	8 974,68
8 Glucosa + maltosa	11 036,04	15 088,50
9 Papa + zanahoria	6 627,78	9 807,09
10 Papa + zanahoria+ quitina	11 668,42	18 144,35
11 Jugo de vegetales (V8)	5 557,62	7 802,76
12 Testigo (agar-agua)	7 236,55	8 005,69

Fuente: Elaboración propia, 2021.

La rentabilidad de cada medio líquido se calculó relacionando el costo por litro entre la producción blastosporas, por lo tanto, entre más blastosporas produzca el medio se vuelve más rentable, por eso el medio agar-agua (testigo) que fue en el que produjo una menor cantidad de esporas, es el menos rentable a pesar de tener un costo por debajo del de otros medios. Los medios de cultivo más eficientes fueron el medio líquido E, con una relación de costo/beneficio de 0,12 colones por cada millón de blastosporas (medido a los 22 días de incubación) seguido de los medios H2 y H1 con un costo ambos de 0,16 colones por cada millón de blastosporas (Tabla 11).

Tabla 11. Rentabilidad de los medios líquidos según los costos de producción de blastosporas de cada tratamiento. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021.

Tratamiento	Costo/Producción promedio de blastosporas x 1000000/L a los 22 día
1 (PDA)	¢ 0,60
2 (SDA)	¢ 1,53
3 Medio E	¢ 0,12
4 Medio H + quitina	¢ 0,97
5 Medio H + quitosano	¢ 0,30
6 Medio H1	¢ 0,16
7 Medio H2	¢ 0,16
8 Glucosa + maltosa	¢ 0,61
9 Papa + zanahoria	¢ 1,23
10 Papa + zanahoria + quitina	¢ 15,77
11 Jugo de vegetales (V8)	¢ 2,26
12 Testigo (agar-agua)	¢ 3 040,57

Fuente: Elaboración propia, 2021.

La rentabilidad de cada medio sólido se calculó relacionando el costo por litro entre la producción conidios, por lo tanto, entre más conidios produzca el medio se vuelve más rentable, por eso el medio agar agua (testigo) que fue en el que produjo una menor cantidad de esporas, es el menos rentable a pesar de tener un costo por debajo de otros medios. Los medios de cultivo más eficientes fueron el medio H + quitosano, con una relación de costo/rendimiento de 0,28 colones por cada millón de conidios (medido a los 34 días de incubación) seguido del medio PDA con 3,40 colones, el resto de los tratamientos oscila el costo/rendimiento entre 6,51 y 18,14 colones por cada millón de conidios. (Tabla 12).

Tabla 12. Rentabilidad de los medios sólidos según los costos de producción de conidios de cada tratamiento. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Julio 2021.

Tratamiento	Costo/Producción promedio de conidios x 1000000/L a los 34 días
1 (PDA)	₡ 3,40
2 (SDA)	₡ 11,47
3 Medio E	₡ 9,20
4 Medio H + quitina	₡ 11,44
5 Medio H + quitosano	₡ 0,28
6 Medio H1	₡ 6,51
7 Medio H2	₡ 8,97
8 Glucosa-maltosa	₡ 15,09
9 Papa + zanahoria	₡ 9,81
10 Papa + zanahoria + quitina	₡ 18,14
11 Jugo de vegetales (V8)	₡ 9,75
12 Testigo (agar-agua)	₡ 160,11

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Otro aspecto que se debe valorar en la elección de un medio apropiado para reproducir *H. nodulosa* es la susceptibilidad a la contaminación, ya que medios muy nutritivos como papa + zanahoria, papa + zanahoria + quitina, y jugo de vegetales (V8), tienden a contaminarse con facilidad, haciendo difícil su manipulación. Por esta razón, desde el punto de vista práctico se recomienda trabajar con los medios: PDA, medio H, medio H + quitina, medio H + quitosano y medio glucosa + maltosa. Otro aspecto que se debe indicar es que existe mayor facilidad en la consecución de los ingredientes de estos últimos medios de cultivo.

Por lo tanto, uno de los aportes de este estudio es que da la opción de varios medios de cultivo con los cuales se puede reproducir el hongo masivamente, con el fin de reproducir un producto o bioacaricida que pueda ser utilizado por la mayoría de los agricultores como bien dice Gómez *et al*, (2014) con el fin de incorporarlo en una estrategia de manejo del ácaro *S. pinki* Smiley en el cultivo de arroz para una producción más limpia.

Consideraciones para el uso de *Hirsutella nodulosa* en campo

Para una eventual incorporación de *H. nodulosa* en una estrategia de manejo integrado del ácaro *S. spinky* se deben considerar los siguientes aspectos:

1. Los insecticidas / acaricidas no logran eliminar las poblaciones de ácaros en su totalidad, sobre todo los que se encuentran alojados en las vainas inferiores y aún en las vainas superiores son inaccesibles a las sustancias químicas, por lo que se requieren opciones de manejo que logren llegar a estos sitios.

2. Las distintas variedades de arroz que se siembran en Costa Rica responden de manera diferencial a las poblaciones de *S. spinky* de acuerdo con la etapa fenológica; sin embargo, en la mayoría de las variedades se presenta un aumento en las poblaciones del ácaro a los 55 días después de la siembra, siendo el pico de máxima densidad poblacional a los 70 días después de germinado (ddg). Estas poblaciones del ácaro predominan en las vainas dos y tres, lo cual permite dirigir el muestreo a estas vainas en específico, disminuyendo el tiempo invertido en monitoreo.

3. *Steneotarsonemus spinky* vive y se reproduce dentro de las vainas de las hojas del arroz, tiene una alta tasa de reproducción ya que la hembra cuenta con una longevidad de 15 días, oviposita hasta 78 huevos en grupos de 2 a 6 y es común observar grandes masas de huevos en vainas muy infestadas.

4. Con base en lo anterior y en el supuesto de contar con una cepa de *H. nodulosa* virulenta y efectiva y un proceso de reproducción eficiente, el cual incluye un medio de cultivo y matriz para reproducirlo masivamente de manera rentable, es posible establecer algunos aspectos dirigidos a desarrollar una táctica de aplicación en campo; sin embargo, esto debe ser validado. Por ejemplo, la aplicación de *H. nodulosa* debe realizarse en etapas tempranas del cultivo, iniciando a los 20 ddg que es el momento en que se recomienda iniciar los muestreos de monitoreo, o cuando el cultivo se encuentra en la etapa comprendida entre la emergencia del primordio floral hasta antes de que la panícula llegue a la vaina de la hoja bandera. Se ha determinado este momento como el periodo crítico de susceptibilidad

del cultivo al daño por el ácaro, ya que la planta comienza a producir mayor cantidad de nutrientes para la formación de la espiga. La elevada concentración de nutrientes es aprovechada por el ácaro para reproducirse aceleradamente y ocasionar mayor daño a la espiga en formación. La meta es mantener una población de ácaros lo más baja posible al llegar a la etapa de panzoneo o embuche en la vaina de la hoja bandera. Posterior a esta etapa el riesgo por daños causados por *S. spinky*, tendrá efectos negativos en la producción.

5. Los momentos de aplicación se deben realizar dependiendo del ciclo de cultivo de cada variedad de arroz; por ejemplo, en variedades de ciclo corto, las aplicaciones de *H. nodulosa* se podrían realizar entre los 35 y 40 ddg, en variedades de ciclo intermedio, se recomienda hacer una aplicación a los 40 – 45 ddg, y en variedades de ciclo largo, aplicar a los 60 ddg. Por otra parte, los niveles de acción (promedio de ácaros por vaina), constituyen una guía para determinar el momento de aplicación de *H. nodulosa*, para evitar situaciones no deseadas antes de la etapa crítica que sería cuando se cuantifican más de 15 ácaros en promedio por vaina. Para esto, es necesario realizar seguimientos periódicos del nivel poblacional y del daño al cultivo, de esto dependerá la frecuencia de las aplicaciones, las cuales deberán dirigirse a las hojas banderas para que el producto ingrese y /o asegurar el contacto con los ácaros adultos que inician migración, ya sea a través del viento que es el principal agente diseminante o animales incluyendo a los insectos.

6. El equipo para aplicación del hongo debe ser exclusivo para este fin, además se deben utilizar tácticas de manejo de otras plagas que no interfieran con el hongo, principalmente el uso de fungicidas que eliminen a *H. nodulosa* del campo. Por esta razón, aplicaciones de fungicidas deben realizarse con varios días de anticipación o varios días posteriormente a la aspersión de *H. nodulosa*. Posterior a la aplicación del hongo, se recomienda realizar inspecciones de campo para observar ácaros parasitados y de esta manera realizar un control de calidad de la aspersión.

7. En el Anexo 11 se incluye un ejemplo del costo de aplicación en una hectárea en el cultivo de arroz asumiendo un volumen de aplicación con una dosis provisional ficticia basado en los estudios de Rosas y Sampedro (2006), de los mejores medios obtenidos en este estudio.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- En este estudio se evaluaron fuentes diversas para suplir los requerimientos nutricionales para el desarrollo del hongo acaropatógeno *H. nodulosa*. El comportamiento variable que se observó en cuanto a la concentración de micelio, blastosporas e incluso la morfología de las colonias en medios sólidos, muestran que *H. nodulosa* responde diferencialmente al medio en el que se desarrolla. Este factor puede usarse para continuar perfeccionando un medio ideal para el escalamiento en la producción.
- En general el crecimiento radial del hongo *H. nodulosa* en los diferentes medios sólidos evaluados muestra un crecimiento muy lento (0,31 mm diarios).
- El hongo *H. nodulosa* produjo diferentes concentraciones de conidios dependiendo del medio sólido en el que creció.
- La producción de blastosporas presentó un crecimiento óptimo en un sistema de agitación orbital con movimiento giratorio de 120 rpm, por lo que resulta efectivo para la producción masiva del hongo.
- Las blastosporas obtenidas en medio H sólido e inoculadas en arroz cocido produjeron abundante esporulación del hongo en su fase conidial, mediante la producción de fiálides y conidios típicos de *H. nodulosa*.

- Se redujo el tiempo efectivo de producción de blastosporas del hongo utilizando medios de cultivo con fuentes nutricionales variadas. La cosecha de las blastosporas puede realizarse a las 48 horas de inoculado el medio de cultivo.
- El medio líquido H + quitosano produjo blastosporas equivalentes a una concentración de $3,9 \times 10^7$ blastosporas/mL en un periodo de 15 días; sin embargo, a los 2 días de incubación la concentración disminuyó a $2,6 \times 10^7$ b/mL.
- Los medios PDA, medio H + quitina, medio H + quitosano, medios H1 y H2, medio papa + zanahoria, medio glucosa + maltosa mostraron buen potencial para reproducir a *H. nodulosa*.
- La producción bifásica mostró ser la estrategia más conveniente y efectiva para la producción de *H. nodulosa*, aumentando la producción de conidios y disminuyendo el tiempo a cosecha.
- El quitosano mostró ser un componente determinante para aumentar la producción de blastosporas al igual que el uso de azúcar en la preparación del medio líquido.
- La posibilidad de reproducir masivamente el hongo *H. nodulosa* es adecuada, ya que este hongo se puede emplear como un bioplaguicida en programas MIP en arroz.
- El mejor medio sólido para mantener la cepa de *H. nodulosa* fue el medio H2 y el mejor medio líquido para producción masiva fue el medio H + quitosano, por promover la producción de blastosporas y tener baja propensión a contaminarse durante la incubación del hongo.
- El protocolo más recomendable para optimizar la producción de conidios de *H. nodulosa*, según los resultados observados es 1-la purificación del inóculo en los medios sólidos H1, H2 o medio E, 2-fermentación entre los 2 y 11 días en los medios líquidos : PDA, SDA, E, H + quitina, H+ quitosano, H1, H2 y glucosa + maltosa, y 3-inoculación de arroz esterilizado como sustrato sólido, permitiendo un tiempo de crecimiento y desarrollo del hongo de 10 días para obtener la mayor concentración de conidios, entre los 50 y 170 conidios / g de arroz.

- El tratamiento con la mayor rentabilidad basado en costo y rendimiento en la producción de blastosporas fue el medio E y el de conidios fue el medio H + quitosano.

Recomendaciones

- Probar otros medios sólidos y medios líquidos, así como la incorporación tanto de diferentes tipos de caparazones de crustáceos (jaiba, langostinos, camarones, langostas, calamares), como de elaborados de quitosano basados en el peso molecular y grado de desacetilación.
- Hacer pruebas variando pH, así como la proporción de los componentes del medio para optimizar el rendimiento.
- Es necesario comparar la infectividad de los conidios, blastosporas y micelio en concentraciones variadas para buscar la combinación más efectiva en la elaboración de un bioplaguicida eficiente.
- Revigorizar las cepas con el fin de aumentar la esporulación del hongo manteniendo buena capacidad infectiva.
- La composición de los medios en los cuales se reproduce *H. nodulosa* va a influir no solo en su crecimiento, sino también en su virulencia. Por esta razón, para poder concluir sobre cuál es el medio de cultivo más apropiado, sería indispensable evaluar la efectividad de los conidios y del micelio producido en los diferentes medios.
- Validar en campo antes de utilizar dentro de un programa de manejo Integrado de *S. pinki*.

Bibliografía

- Almaguel, R. L. (2002) Control biológico de ácaros fitófagos en diferentes cultivos. Laboratorio de Manejo de Plagas INISAV, 110 y 5ta B # 514 Playa, Ciudad de la Habana, CUBA. 17p.
- Almaguel, R. L.; Santos, A.; Torre, P.; Botta, E.; Hernández, J.; Cáceres, I.; Ginarte, A. (2003). Dinámica de población e indicadores ecológicos del ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley 1967 (Acari: Tarsonemidae) en arroz de riego en Cuba. Fitosanidad. La Habana. 7(1): 23-30.
- Álvarez, B. F. (2004). Apreciaciones sobre el ácaro blanco del arroz (*Steneotarsonemus spinki* Smiley). Informe Servicio Fitosanitario del Estado, Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG. DirecciónmLión Regional Chorotega. Liberia (Costa Rica), 24 de junio. 3 p.
- Álvarez, B. F. (2005). Control químico del ácaro de la vaina del arroz. Ministerio de Agricultura y Ganadería. DiremLión Regional Chorotega. Liberia. 2 p.
- Cabrera, R. I. (1978a). Presencia de *Hirsutella* sp. sobre *Polyphagotarsonemus latus*. Cienc. Tec. Agric. Cítricos y otros frutales. La Habana, Cuba. 1(3): 39-42.
- Cabrera, R. I. (1987b). Estudio de dos especies de *Hirsutella* y sus hospedantes en el cultivo de guayaba *Psidium guajava*. Agrotecnia 19(1): 29-34.
- Cabrera, R. I.; Domínguez, D. (1987). El hongo *Hirsutella nodulosa* nuevo parasito para el ácaro del cocotero *Eriopyes guerreronis*. Ciencia y técnica en la Agricultura. Cítricos y otros frutales. La Habana, Cuba. 10(1):41-51.
- Cabrera, R. I.; Blanco, J. J.; Domínguez, D. Y. (1987). Comunicación Informe de *Hirsutella nodulosa*, enemigo natural del ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus*. Cienc. Tec. Agric. Cítricos y otros frutales. La Habana, Cuba. 10(2): 135-138.
- Cabrera, R.; García, A; Otero-Colina, G; Almaguel, L; Ginarte, A. (2005). *Hirsutella nodulosa* y otros hongos asociados al ácaro tarsonémido del arroz *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en Cuba. Folia Entomológica. México. 44(2): 115-121.
- Cabrera, R. I., Vega, M., Ayra, L. (2006). Un medio simplificado a base de soya más azúcar turbinada de caña para la producción del hongo acaropatógeno *Hirsutella nodulosa* Petch en fase líquida. Fitosanidad. Cuba. 10(4):285-287.
- Chong, R. M. J. 2003. Utilización de medios de cultivos líquidos para la obtención de blastoesporas y conidias de *Beauveria bassiana* (bals.)vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) resistentes a condiciones ambientales. Tesis presentada como requisito para optar al título de Ciencias con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 77 p.
- Consejo Nacional de Producción (CNP). (2022). Registro de productores de arroz. Comunicado el 27 de junio del 2022. Consultado 28 jun 2022. Disponible en <https://cnpprensa.blogspot.com/>.

- Corporación Arrocera Nacional, C.R (CONARROZ). (2017). Informe estadístico periodo 2016-2017. Unidad de inteligencia de Mercados. DiremLión de Operaciones. San José. Costa Rica. 60 p.
- Corporación Arrocera Nacional, C.R. (CONARROZ). (2005). Control químico del ácaro del vaneamiento del arroz *Steneotarsonemus spinki*, Smiley. Actualidad Arrocera. Boletín 1(2):6.
- Corporación Arrocera Nacional, C.R. (CONARROZ). (2018). Estadísticas arroceras. Tomado de: <http://www.conarroz.com/>. Fecha: 1 de julio del 2018.
- Curvelo, G. L.; Rojas, B. J. A. 2010. Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums ascomycetes, deuteromycetes y oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas. Tesis presentada como requisito para para optar los títulos de Microbiólogo Agrícola y Veterinario y Microbiólogo Industrial. Universidad Javeriana de Bogota. 86 p.
- Estrada, S. G. I.; Ramírez, G. M. C. (2019). Micología general. Centro Editorial Universidad Católica de Manizales. 345 p. Consultado 3 may. 2022. Disponible en https://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/2021/03/Micologia_general.pdf.
- Fisher, F. G.; Griffiths, J. T; Thomposon, L.; (1949). An epizootic of *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm) on citrus in Florida. Phythopathology 39: 510-512.
- Gamboa, T. J. A.; León, G. R.; Cartín, L. V.; Álvarez, B. F.; Garita, C. I. (2008). Determinación de plantas hospedantes alternas de *Steneotarsonemus spinki* en zonas arroceras de Costa Rica. Heredia, Costa Rica. Revista Alcances Tecnológicos 6 (1): 13-25.
- Gómez, R. H.; Zapata G. A.; Torres Del Aguila. E.; Tenorio. C. M. 2014. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. laboratorio de entomopatógenos. SCB – SENASA. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Perú. 37 P.
- Hernández, J. L.; Gómez, P.; Galano, R.; Botta, E.; Duany, A.; Ginarte, A.; y Berbén, T. (2005). Influencia del marco y densidad de siembra, la fertilización nitrogenada y el manejo de agua sobre la población y daños de *Steneotarsonemus spinki* y los patógenos a él asociados. Revista cultivos tropicales. Vol. 25 (. N° 3): 44 p.
- Holdridge, L. (1987). Ecología basada en zonas de vida. Traducido por Humberto Jiménez Saa. San José, Costa Rica. IICA. 216 p.
- Holdridge, L. R. (1947). Determination of World Plant Formations from Simple Climatic Data. Science 105 (2727): 367-368.
- Hummel, N. A.; Castro, B. A.; McDonald, E. M.; Pellerano, M. A. y Ochoa, R. (2009). The panicle rice mite, *Steneotarsonemus spinki* Smiley, a re-discovered pest of rice in the United States. Crop Protection, Vol. 28. N° 7: 547-560.
- Lacey, L.; Kirk, A.; Millar, L.; Mercadier, G.; Vidal, C. (1999). Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia*

- argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects (en línea). *Biocontrol Science and Technology* (9): 9-18. Consultado 4 mar. 2020. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/loi/cbst20>.
- Lárez, V. C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polimeros*. Nº 4(2): 91-109.
- León, G. R. (2008). Evaluación de diferentes germoplasmas de arroz (*Oryza sativa*) para determinar la preferencia del ácaro *Steneotarsonemus spinki* (Tarsonemidae) en Costa Rica. *Revista Alcances Tecnológicos* 6(1):27-44.
- León, G. R.; Avilés, Ch. J. (2009). Evaluación de medios de cultivo para inducir la esporulación del acaropatógeno *Hirsutella nodulosa*. En memoria del PCCMCA-2009, San Francisco, Campeche, México.
- León, G. R. (2010). Comportamiento poblacional del ácaro *Steneotarsonemus spinki* en variedades de arroz utilizadas en Costa Rica. *Alcances Tecnológicos* 8(1):13-26.
- León, G. R.; Vargas, C. L. G. (2011). Medio líquido con quitosano para la producción de blastosporas de *Hirsutella nodulosa* Petch para el manejo de *Steneotarsonemus spinki* en el cultivo de arroz. En memoria LVI Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de cultivos y Animales, PCCMCA. Sonsonate, El Salvador. P 21.
- León, G. R., Tinoco, R., Dobles, G. R. (2004). Desarrollo de alternativas para el manejo y control integrado del ácaro *Steneotarsonemus spinki* (Tarsonemidae) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*). GR01EE301-1-04. Archivos Técnicos, INTA, San José, CR. 6 p.
- Liu, Y; Tsai, J. (2000). Effects of temperature on biology and life table parameters of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) (en línea). *Ann. Appl. Biol.* (137):201-206. Consultado el 15 de febrero de 2016. Disponible en:
- Minter, D. W.; Brady, B. L. (1980). Mononematous species of *Hirsutella*. *Trans. British Mycological Society*. 74(2) 271-282.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) (2017). Manejo Integrado del Ácaro del Arroz (*Steneotarsonemus spinki* Smiley) y las enfermedades asociadas. San Salvador – El Salvador. 57 pp.
- Osuna, A. N.; Estrada, F. J.; Caro, P. H.; Galván, B.; Cárdenas, H. M. (2003). Virulencia de conidios aéreos y propágulos de cultivo sumergido de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith contra ninfas de Bemisia (Gennadius) spp. (en línea). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(003):292-299. Consultado 6 abr. 2020. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/612/61221308.pdf>.
- Quirós, E.; Gordón, R.; Camargo, I.; y Fernández, F. (2006). Dinámica poblacional del ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley 1967 (Acari: Tarsonemidae), en diferentes épocas de siembra y etapas fenológicas en dos variedades de arroz. IDIAP. Penonomé, Coclé, Panamá. 2004-2005. 3 p.

- Ramos, M., Rodríguez, H. (2000). Ciclo de desarrollo de *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) en laboratorio. Rev. Protección Veg. 15 (2): 130-131.
- Ramos, M.; Rodríguez, H. (2001). Aspectos biológicos y ecológicos de *Steneotarsonemus spinki* en arroz, en Cuba. Revista Manejo Integrado de Plagas MIP-CATIE (Costa Rica) 61:48-52.
- Reyes, H. L. A. (2005). Ácaro del vaneamiento del arroz *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Prostigmata: Tarsonemidae). Colombia. CIAT. Consultado: 1 jun. 2008. Disponible en www.l.reyes@cglar.org.
- Riaz, A.; Shah, F. A.; Butt, T. M. (2013). Intra-Specific variability among *Metarhizium anisopliae* estrains in their ability to produce blastospores in liquid culture media. Pakistan Journal of Botany. 45(3): 1099-1103.
- Ríos, J. J.; Quintero, J.; Apodaca, M.; Loredó, J.; Corrales, D. (2008). Manual de prácticas de micología. Departamento de Parasitología rama de Fitopatología Universidad Autónoma de Sinaloa Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte Sinaloa. Consultado 20 may. 2018. Disponible en <http://www.slideshare.net/jloveuas/manual-micologia>.
- Rosas, A. J. L.; Boucía, D. G.; Lezama, R.; Sims, K.; Pescador, A. (2003). Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii*, inhibit oviposition by the two-spotted spider mites *Tetranychus urticae*. Applied and Experimental Acarology 39: 213-225.
- Rosas, A. J. L.; Sampedro, L. (1992). Presencia del entomopatógeno *Hirsutella thompsonii* Fisher en el estado de Guerrero. Ciencia. 6(1):18-25.
- Sanabria, U. C. (2004). Ácaro del Vaneo del arroz *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Tarsonemidae). Charla presentada. San José, C R.
- Sánchez, B. A. (2006). Caracterización y utilización de hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*Pleuoncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos. Tesis presentada como requisito para obtener el grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Universidad Nacional de Costa Rica. 115 p.
- Santos, H. A.; Almaguel, R. L.; De la Torre, S. P.; Cortiñas, A. J.; Cáceres, S. I. (2002). Ciclo biológico del ácaro *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari:Tarsonemidae) en arroz (*Oriza sativa* L.) en Cuba. Fitosanidad. 6(2): 15-18.
- Santos, R. M.; Navia, D.; Cabrera, R. I. (2004). *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Prostigmata: Tarsonemidae) una amenaza para a cultura do arroz no Brasil. Recursos Genéticos e Biotecnología. 1er edición. (Correo electrónico). Brasil EMBRAPA. Consultado feb. 2006. Disponible en www.cenargen.embrapa.br. 0102-0110; 117:54.
- Sociedad Entomológica do Brasil. (2005). *Steneotarsonemus spinki*: Organismo causante del vaneado de la panícula y pudrición de la vaina del arroz. Consultado febr. 2006. Disponible en regina.sugayama@neotrop.entomol.com.br.

- Spears, A. t.; Yothers, W. W. (1924). Is the en entomogenous fungus attacking the citrus rust mite in Florida?. Science. 60:41-42.
- Téllez, J.; Cruz, R. M. G.; Mercado, F. Y.; Asaff, T. A.; y Arana, C. A. (2009). Mecanismos de acciónmLión y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Autor para correspondencia: *Ainhoa Arana Cuenca* ainhoa@upp.edu.mx.
- Thomas, K. C.; Khachatourians, G. G.; Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia in submerged culture. Can. J. Microbiol. 33:12-20.
- Toro, S. S.; Mesa, C. N. C. (2015). Parámetros poblacionales y comportamiento de *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) en el cultivo de arroz. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia. Acta Agronómica 64(2): 186-193.
- Tseng, Y. H. (1985). Mites associated with weeds, paddy rice and upland rice fields in Taiwan. Acarology. 6VI (2): 770-780.
- Ulloa, M.; Hanlin, R. (2006). Nuevo diccionariomLionario ilustrado de micología. American Phytopathological Society. Minnessota, USA. 672pp.

Anexos

Anexo 1. Medición de pH y temperatura de medios sólidos. Laboratorio de Fitoprotección INTA-CR 2018.

Tratamiento	pH sin corrección	pH final	Temperatura °C
PDA	6,0	3,84	39
SDA	5,6	4,29	44
Medio E	5,9	4,26	40
Medio H + quitina	4,6	4,40	40
Medio H + quitosano	6,7	5,80	40
Medio H1	6,5	3,68	40
Medio H2	5,9	4,23	40
Glucosa + maltosa	6,7	4,12	40
Papa + zanahoria	5,5	4,07	40
Papa + zanahoria + quitina	3,4	3,78	43
Jugo de vegetales (V8)	6,2	6,16	37
Testigo absoluto	6,3	3,54	44

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Anexo 2. Medición de pH de cada uno de los tratamientos líquidos. Laboratorio de Fitoprotección INTA-CR 2018.

Tratamiento	pH sin corrección	pH final
PDA	6,0	3,74
SDA	5,6	3,93
Medio E	5,9	3,48
Medio H + quitina	4,6	5,73
Medio H + quitosano	6,7	4,48
Medio H1	6,5	3,48
Medio H2	5,9	3,72
Glucosa + maltosa	6,7	3,54
Papa + zanahoria	5,5	3,46
Papa + zanahoria + quitina	3,4	5,54
Jugo de vegetales (V8)	6,2	5,46
Testigo absoluto	6,3	3,54

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Anexo 3. Análisis de los datos para los medios de cultivo sólidos.

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
342	981,81	1222,18	-424,91	0,22	0,78	0,81

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	224	912,00	<0,0001
Trat	11	58	34,81	<0,0001
DDI	4	224	178,42	<0,0001
Trat:DDI	44	224	7,82	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	224	251,76	<0,0001
Trat	11	58	16,54	<0,0001
DDI	4	224	179,51	<0,0001
Trat:DDI	44	224	7,82	<0,0001

Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Trat	11	58	34,81	<0,0001
2	DDI	4	224	178,42	<0,0001
3	Trat:DDI	44	224	7,82	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*

Formula: $\sim 1 | ID$

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,33

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 | DDI$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
17	1,00
20	1,68
27	6,31
30	7,68
34	8,13

Crecimiento - Medias ajustadas y errores estándares para DDI*Trat

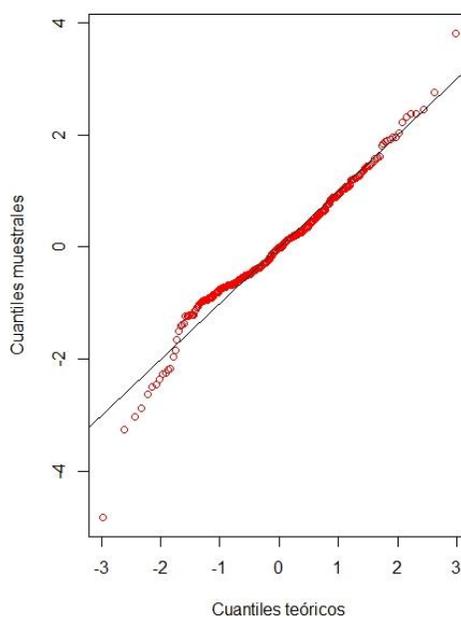
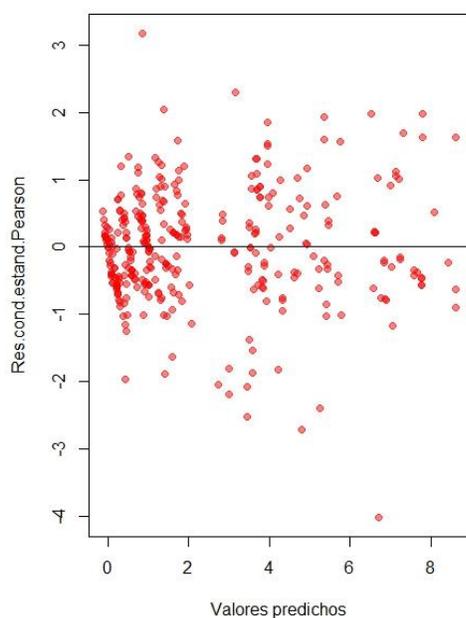
DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

DDI	Trat	Medias	E.E.	
34	V8	8,33	0,73	A
30	V8	7,50	0,69	A
27	V8	7,50	0,58	A
30	Medio H-Quitina	7,00	0,69	A
34	Medio H-Quitina	6,92	0,73	A
34	Papa-Zanahoria	6,50	0,73	A
27	Papa-Zanahoria	5,33	0,58	B
30	Papa-Zanahoria	5,33	0,69	B
34	Papa-Zanahoria-Quitina	5,25	0,80	B
27	Medio H-Quitina	5,09	0,63	B
34	Medio H1	4,75	0,73	B
34	Medio E	4,50	0,73	B
34	PDA	4,25	0,90	B
27	PDA	3,87	0,71	B
30	PDA	3,87	0,85	B
30	Medio E	3,75	0,69	B
27	Medio E	3,75	0,58	B
34	Medio H-Quitosano	3,69	0,80	B
30	Papa-Zanahoria-Quitina	3,45	0,76	B
27	Papa-Zanahoria-Quitina	3,45	0,63	B
20	V8	3,42	0,20	B
27	Medio H1	3,33	0,58	B
30	Medio H1	3,33	0,69	B
27	Medio H-Quitosano	1,84	0,70	C
30	Medio H2	1,75	0,69	C
17	V8	1,67	0,16	C
34	Medio H2	1,67	0,73	C
27	Glucosa-Maltosa	1,62	0,58	C
20	Medio H-Quitina	1,61	0,20	C
20	Papa-Zanahoria	1,58	0,20	C
34	Testigo	1,50	0,73	C
30	Medio H-Quitosano	1,39	0,76	C
34	SDA	1,25	0,73	C

27	Medio H2	1,08	0,58	C
34	Glucosa-Maltosa	1,08	0,73	C
17	Papa-Zanahoria	0,93	0,16	C
27	Testigo	0,92	0,58	C
30	Testigo	0,92	0,69	C
27	SDA	0,83	0,58	C
30	SDA	0,83	0,69	C
17	Medio H1	0,78	0,16	C
20	Medio H1	0,78	0,20	C
20	Papa-Zanahoria-Quitina	0,75	0,20	C
20	PDA	0,75	0,25	C
17	Medio H-Quitina	0,70	0,16	C
30	Glucosa-Maltosa	0,67	0,69	C
20	Glucosa-Maltosa	0,61	0,20	C
20	Testigo	0,52	0,20	C
17	PDA	0,42	0,20	C
17	SDA	0,33	0,16	C
17	Papa-Zanahoria-Quitina	0,33	0,16	C
20	Medio E	0,29	0,20	C
20	Medio H2	0,28	0,20	C
17	Testigo	0,23	0,16	C
17	Medio E	0,22	0,16	C
20	SDA	0,18	0,20	C
17	Medio H2	0,16	0,16	C
17	Glucosa-Maltosa	0,15	0,16	C
17	Medio H-Quitosano	0,10	0,16	C
20	Medio H-Quitosano	0,00	0,20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Anexo 4. Análisis de los datos para los medios de cultivo líquidos.

Resultados para el modelo: mLm.modelo.007_Conteo_REML

Variable dependiente: Conteo

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
550	16018,56	16420,55	-7912,28	13432506,28	0,62	0,62

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	406	341,66	<0,0001
Trat	11	60	59,62	<0,0001
DDI	6	406	11,49	<0,0001
Trat:DDI	66	406	3,31	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	406	1,64	0,2015
Trat	11	60	74,07	<0,0001
DDI	6	406	1,21	0,3016
Trat:DDI	66	406	3,31	<0,0001

Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Trat	11	60	59,62	<0,0001
2	DDI	6	406	11,49	<0,0001
3	Trat:DDI	66	406	3,31	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1|ID

Desvíos estándares y correlaciones

(const)
(const) 3899,29

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: varIdent

Formula: ~ 1 | Trat

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
-----------	-------

Glucosa-Maltosa	1,00
Medio-E	2,62
Medio H-Quitina	0,61
Medio H-Quitosano	2,17
Medio H1	2,03
Medio H2	1,77
Papa-Zanahoria-quitina	0,06
Papa-Zanahoria	0,37
PDA	0,53
SDA	0,93
Testigo	6,9E-04
V8	0,17

Conteo - Medias ajustadas y errores estándares para Trat*DDI

DGC (Alfa=0.05)

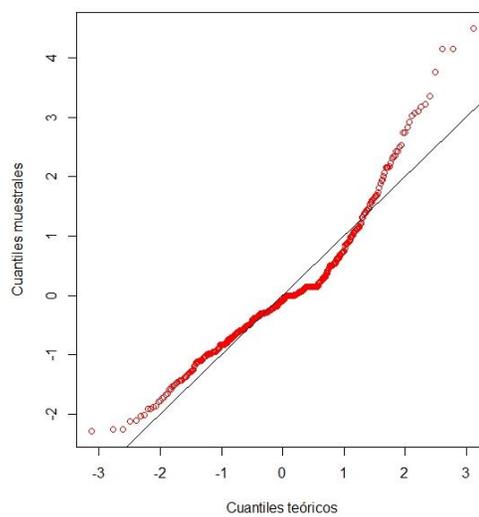
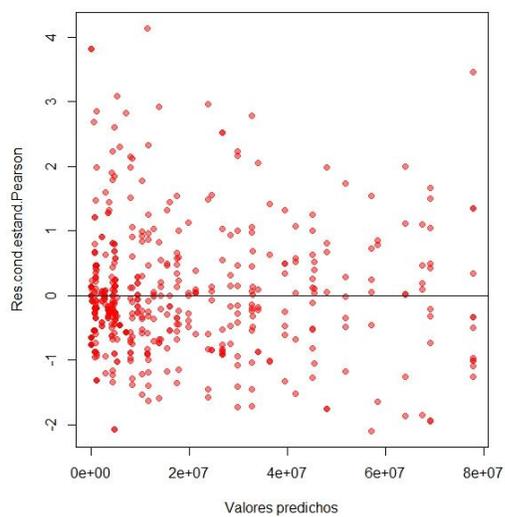
Procedimiento de corrección de p-valores: No

Trat	DDI	Medias	E.E.	
Medio H2	15	77895833,33	6866264,88	A
Medio-E	15	69219999,94	11138860,88	A
Medio-E	11	67479999,94	15752728,03	A
Medio H2	5	64091666,67	9710364,79	A
Medio-E	18	58383332,30	20336684,44	A
Medio H1	5	57116666,67	11143967,80	A
Medio H2	8	51891666,67	9710364,79	A
Medio H1	11	47958333,33	11143967,80	B
Medio-E	8	45399999,94	15752728,03	B
Medio H1	15	45050000,09	8632080,43	B
Medio H1	8	41616666,67	11143967,80	B
Medio H-Quitosano	15	39481249,61	10303413,18	B
Medio-E	22	36287499,29	17612085,35	B
Medio H1	2	33908333,33	11143967,80	B
Medio-E	5	32949999,94	15752728,03	B
Glucosa-Maltosa	15	32708333,33	3877630,89	B
Glucosa-Maltosa	11	29766666,67	5483797,96	B
Glucosa-Maltosa	8	29725000,00	5483797,96	B
Medio H2	11	28433333,33	9710364,79	B
Medio H-Quitosano	5	26733333,33	11897356,64	B
Medio H-Quitosano	2	26683333,33	11897356,64	B
Medio H-Quitosano	11	24604166,67	11897356,64	B
Medio H-Quitina	11	23729166,67	3364120,40	B
Medio-E	2	21208333,33	14380207,47	B
Medio H2	2	19858333,33	9710364,79	B
Glucosa-Maltosa	5	17716666,67	5483797,96	B
Medio H-Quitina	15	17350000,00	2378792,62	B
Medio H-Quitosano	8	15975000,00	11897356,64	B
Medio H-Quitina	8	15433333,33	3364120,40	B
Medio H-Quitina	5	14133333,33	3364120,40	B

PDA	8	13716666,67	2909501,29	B	
Glucosa-Maltosa	2	12691666,67	5483797,96	B	
Medio H-Quitina	2	11641666,67	3364120,40	B	
PDA	11	11637500,00	2909501,29	B	
SDA	11	11352666,67	5110661,57	B	
PDA	5	10316666,67	2909501,29	B	
Papa-Zanahoria	11	10275000,00	2047871,93	B	
Medio H2	22	9350000,00	9710364,79	B	
Medio H2	18	9350000,00	9710364,79	B	
Papa-Zanahoria	15	8275000,00	1448064,56	B	
PDA	15	7980833,33	2057328,40	B	
SDA	18	7058333,33	5110661,57	B	
SDA	22	5766666,67	5110661,57		C
Papa-Zanahoria	8	5133333,33	2047871,93		C
PDA	22	4766666,67	2909501,29		C
PDA	18	4766666,67	2909501,29		C
V8	11	4708333,33	927040,02		C
Papa-Zanahoria	22	4691666,67	2047871,93		C
Papa-Zanahoria	18	4691666,67	2047871,93		C
PDA	2	4593333,33	2909501,29		C
Glucosa-Maltosa	22	4333333,33	5483797,96		C
Glucosa-Maltosa	18	4333333,33	5483797,96		C
V8	15	4250000,00	655517,25		C
Papa-Zanahoria	5	4150000,00	2047871,93		C
SDA	15	3525000,00	3613783,63		C
Medio H-Quitina	22	3466666,67	3364120,40		C
Medio H-Quitina	18	3466666,67	3364120,40		C
V8	5	2883333,33	927040,02		C
Medio H1	22	2624999,10	13648517,41		C
Medio H1	18	2624999,10	13648517,41		C
V8	22	2208333,33	927040,02		C
V8	18	2208333,33	927040,02		C
Papa-Zanahoria-quitina	11	975000,00	304436,51		C
Papa-Zanahoria-quitina	5	950000,00	304436,51		C
Papa-Zanahoria	2	933333,33	2047871,93		C
Papa-Zanahoria-quitina	15	900000,00	215272,06		C
V8	8	800000,00	927040,02		C
Papa-Zanahoria-quitina	2	708333,33	304436,51		C
Papa-Zanahoria-quitina	22	650000,00	304436,51		C
Papa-Zanahoria-quitina	18	650000,00	304436,51		C
Papa-Zanahoria-quitina	8	400000,00	304436,51		C
V8	2	183333,33	927040,02		C
Testigo	11	8333,33	4123,23		C
Testigo	8	8333,33	4123,23		C
Medio H-Quitosano	22	0,42	16825403,12		C
Medio H-Quitosano	18	0,42	16825403,12		C
Testigo	22	7,8E-08	4123,23		C
Testigo	2	5,2E-08	4123,23		C

SDA	8	2,4E-08	5110661,57	C
Testigo	15	1,5E-08	3125,31	C
SDA	5	3,0E-09	5110661,57	C
SDA	2	1,9E-09	5110661,57	C
Testigo	5	-1,1E-08	4123,23	C
Testigo	18	-4,5E-08	4123,23	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Anexo 5. Costo por litro de los medios líquidos evaluados.

Tratamiento 1 (PDA)				
Producto	Unidad de Medida	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	300	€ 192,00
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	20	€ 640,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,32	€ 3 546,32
Costo Total				€ 4 556,41

Tratamiento 2 (SDA)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Saboreau	Gramo	€ 114,00	5	€ 570,00
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	40	€ 1 280,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua Destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,32	€ 3 546,32
Costo Total				€ 5 574,41

Tratamiento 3 Medio E (McCoy y Kanavel 1969)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	10	€ 320,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	5	€ 150,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,34	€ 3 608,22
Costo Total				€ 5 072,31

Tratamiento 4 Medio H+ quitina				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Quitina	Gramo	€ 600,00	10	€ 6 000,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,40	€ 3 761,85
Costo Total				€ 11 215,94

Tratamiento 5 Medio H+ quitosano				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Quitosano	Gramo	€ 15,00	10	€ 150,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,40	€ 3 761,85
Costo Total				€ 5 365,94

Tratamiento 6 Medio H1 (Dr. José Luis Rosas)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	3	€ 96,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	0,3	€ 43,80
Peptona	Gramo	€ 172,00	3	€ 516,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	600	€ 106,85
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,37	€ 3 670,12
Costo Total				€ 4 732,77

Tratamiento 7 Medio H2 (Ing. Reinaldo Cabrera)				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona Microbiológica	Gramo	€ 580,00	0,5	€ 290,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,37	€ 3 670,12
Costo Total				€ 5 328,21

Tratamiento 8 Glucosa-maltosa (Cabrera et al 2004)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Maltosa	Gramo	€ 334,37	15	€ 5 015,50
Glucosa	Gramo	€ 10,73	10	€ 107,27
Peptona	Gramo	€ 172,00	10	€ 1 720,00
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,34	€ 3 605,23
Costo Total				€ 10 626,09

Tratamiento 9 Papa-Zanahoria				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	50	€ 32,00
Zanahoria	Gramo	€ 0,29	50	€ 14,50
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	2,14	€ 5 749,43
Costo Total				€ 5 974,02

Tratamiento 10 Medio Papa-Zanahoria-Quitina				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	50	€ 32,00
Zanahoria	Gramo	€ 0,29	50	€ 14,50
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
Quitina	Gramo	€ 600,00	10	€ 6 000,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,82	€ 4 888,02
Costo Total				€ 11 112,61

Tratamiento 11 Jugo de Vegetales (V8)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
V8	Millilitro	€ 3,35	100	€ 335,29
Agar	Gramo	€ 164,00	0	€ -
CaCO3	Gramo	€ 0,06	1,5	€ 0,09
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	500	€ 89,05
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,72	€ 4 609,09
Costo Total				€ 5 033,52

Tratamiento 13 Testigo Absoluto				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Agar	Gramos	€ -	0	€ -
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,26	€ 3 392,68
Costo Total				€ 3 570,77

Fuente: Elaboración propia, 2021.

Anexo 6. Costo por litro de los medios sólidos evaluados.

Tratamiento 1 (PDA)				
Producto	Unidad de Medida	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	300	€ 192,00
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	20	€ 640,00
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,57	€ 4 207,10
Costo Total				€ 7 677,19

Tratamiento 2 (SDA)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Saboreau	Gramo	€ 114,00	5	€ 570,00
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	40	€ 1 280,00
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Agua Destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,57	€ 4 207,10
Costo Total				€ 8 695,19

Tratamiento 3 Medio E (McCoy y Kanavel 1969)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	10	€ 320,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	5	€ 150,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	18	€ 2 952,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09

Tratamiento 4 Medio H+ quitina				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Quitina	Gramo	€ 600,00	10	€ 6 000,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,66	€ 4 452,47
Costo Total				€ 14 366,56

Tratamiento 5 Medio H+ quitosano				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona	Gramo	€ 172,00	0,5	€ 86,00
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Quitosano	Gramo	€ 15,00	10	€ 150,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,66	€ 4 452,47
Costo Total				€ 8 516,56

Tratamiento 6 Medio H1 (Dr. José Luis Rosas)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	3	€ 96,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	0,3	€ 43,80
Peptona	Gramo	€ 172,00	3	€ 516,00
Agar	Gramo	€ 164,00	3,6	€ 590,40
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	600	€ 106,85
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,62	€ 4 360,74
Costo Total				€ 6 013,79

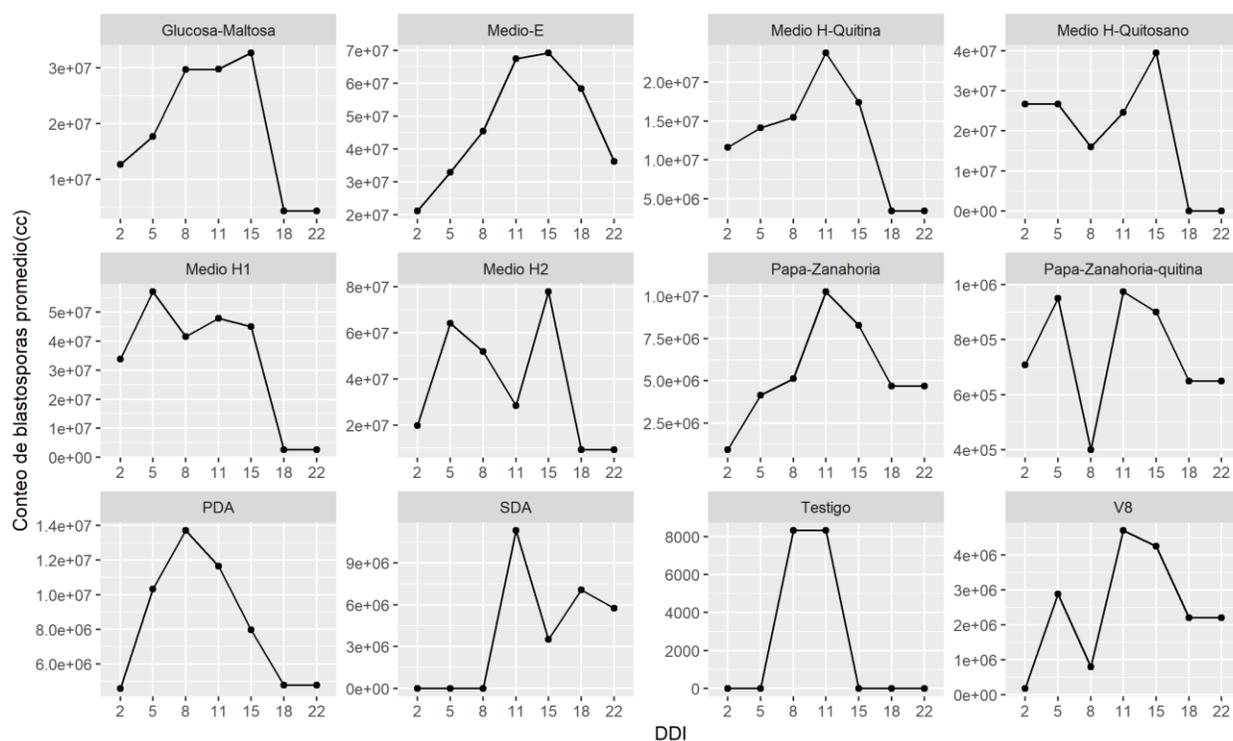
Tratamiento 7 Medio H2 (Ing. Reinaldo Cabrera)				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Dextrosa	Gramo	€ 32,00	5	€ 160,00
Sacarosa	Gramo	€ 30,00	10	€ 300,00
Extracto de Levadura	Gramo	€ 146,00	5	€ 730,00
Peptona Microbiológica	Gramo	€ 580,00	0,5	€ 290,00
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,62	€ 4 360,74
Costo Total				€ 8 478,83

Tratamiento 8 Glucosa-maltosa (Cabrera et al 2004)				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Maltosa	Gramo	€ 334,37	15	€ 5 015,50
Glucosa	Gramo	€ 10,73	10	€ 107,27
Peptona	Gramo	€ 172,00	10	€ 1 720,00
Agar	Gramo	€ 164,00	20	€ 3 280,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	1,60	€ 4 298,83
Costo Total				€ 14 599,69

Tratamiento 9 Papa-Zanahoria				
Producto	Presentación	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	50	€ 32,00
Zanahoria	Gramo	€ 0,29	50	€ 14,50
Agar	Gramo	€ 164,00	15	€ 2 460,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	2,38	€ 6 395,30
Costo Total				€ 9 079,89

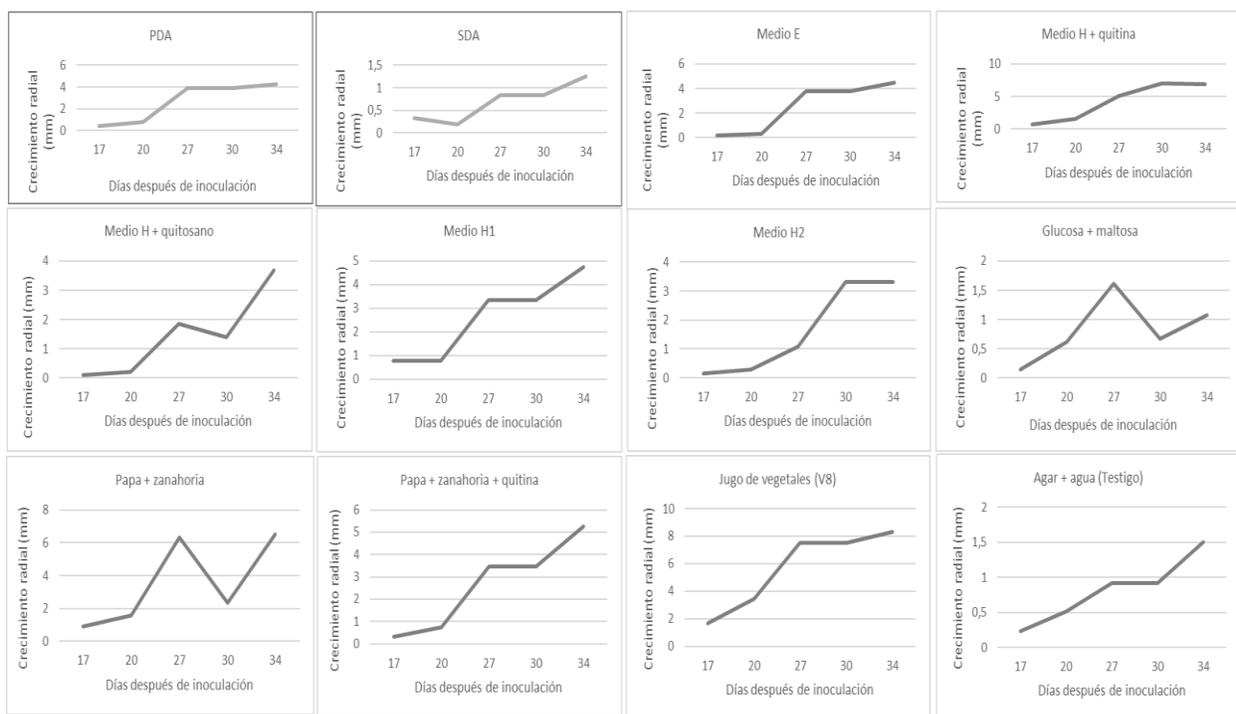
Tratamiento 10 Medio Papa-Zanahoria-Quitina				
Producto	Presentación (g)	Precio Unitario	Cantidad	Costo Total
Papa	Gramo	€ 0,64	50	€ 32,00
Zanahoria	Gramo	€ 0,29	50	€ 14,50
Agar	Gramo	€ 164,00	35	€ 5 740,00
Quitina	Gramo	€ 600,00	10	€ 6 000,00
Agua destilada	Millilitro	€ 0,18	1000	€ 178,09
Recurso Humano	Hora	€ 2 684,91	2,07	€ 5 548,81
Costo Total				€ 17 513,40

Anexo 7. Curvas de producción de blastosporas en los medios líquidos.



Fuente: León, 2018.

Anexo 8. Curvas de crecimiento radial (mm) de los medios sólidos.



Fuente: León, 2018

Anexo 9. Peso de micelio (Filtrado para peso húmedo) y secado para medición de peso seco.

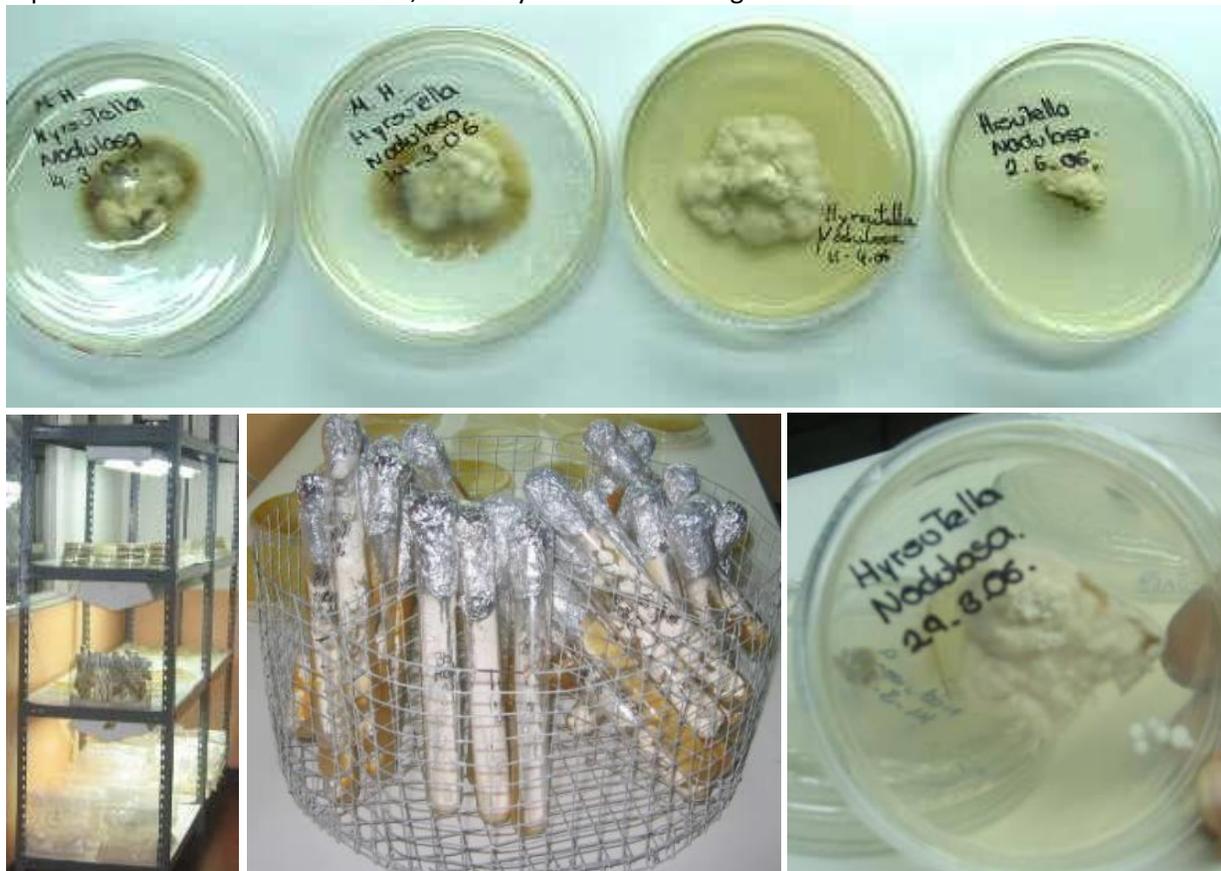
Medio de cultivo	Repetición	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Peso de micelio (g)	Micelio (g/mL)
1- PDA	R3	23,11	1,17	21,94	0,296
	R4	13,77	2,21	11,56	0,193
	R5	12,56		10,40	
		14,91			
		24,25			
2- SDA	1				
	2				
	3				
3- Medio E	R5	4,82	0,3	4,52	0,050
	R6	0,68	0,13	0,55	0,0066
		5,96	0,39		
		1,82			
4- Medio H + quitina	R3	9,58	1,39	8,19	0,105
		10,72			
5- Medio H + quitosano	R2	17,96	0,4	17,56	0,462
	R4	5,32	0,39	4,93	0,065
		6,46			
		19,10			
6- Medio H1 (JLR)	R3	2,67	0,03	2,64	0,030
	R4	2,25	0,03	2,22	0,025
		3,39	1,11		
		3,81	1,17		
7- Medio H2 (X L)	R5	1,93	0,12	1,81	0,022
		3,07			
8- Glucosa + Maltosa	R4	5,96	0,36	5,6	0,067
	R6	4,96	0,52	4,44	0,052
		7,10			
9- Papa + Zanahoria	R2	5,85	0,1	5,75	0,068
	R4	2,69	0,01	2,68	0,089
		6,99	1,24		
		7,92			
	R5	3,83	1,13		
10- Papa + Zanahoria + quitina	R2	2,74	0,03	2,71	0,046
	R3	1,57	0,09	1,48	0,018
		3,88	1,17		
		2,71			
11- Jugo de vegetales (V8)	R4	13,0	0,39	12,61	0,166
	R6	5,34	0,28	5,06	0,076
		3,69	1,11		
		3,40	1,12		
		14,14			

12- Testigo	R2	2,26	0,02	2,24	0,024
	R6	2,55	0,03	2.52	0.027
		2,53	0,39		

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Anexo 10. Imágenes ilustrativas del proceso metodológico y producción de propágulos

Cepas revigorizadas de *Hirsutella nodulosa* creciendo en medio sólidos, conservación de cepas y reproducción en arroz con micelio, fiálides y conidios del hongo.



Fuente: R. León, 2018.

Conservación, desarrollo y reproducción masiva del *Hirsutella nodulosa* en granos de arroz.



Fuente: R. León, 2018.

Preparación de los medios sólidos.



Fuente: R. León, 2018.

Medio V8 (11), papa + zanahoria + quitina (10), y papa + zanahoria (9) presentando un halo que contiene gran cantidad de propágulos. El medio testigo (12) se observa cristalino o transparente respecto a los otros medios.



Fuente: R. León, 2018.

Medio Glucosa + Maltosa, con gran cantidad de propágulos de *Hirsutella nodulosa*.



Fuente: R. León, 2018.

Medio H + quitosano, con gran cantidad de propágulos de *Hirsutella nodulosa*.



Fuente: R. León, 2018.

Anexo 11. Evaluación hipotética de los costos para aplicación del mejor medio líquido y sólido del resultado de este estudio.

Por ejemplo, si se asume hipotéticamente una concentración para aplicar una dosis se debe iniciar desde la tabla 1 donde se muestran los costos por litro de cada medio de cultivo en líquido y sólido utilizados en el presente estudio. En cuanto a los medios líquidos los más costosos fueron los medios papa + zanahoria+ quitina, seguido del medio H + quitina con un costo de ₡11.643,70 por litro y el medio glucosa + maltosa con ₡11.036,04 por litro. Para los demás medios de cultivo los costos rondaron entre ₡4.959,65 y ₡7.236,55 colones. En cuanto a los medios sólidos el más caro con un costo de ₡18.144,35 por litro, fue el medio de cultivo papa + zanahoria + quitina, seguido por el medio glucosa + maltosa con un costo de ₡15.088,50, y el medio H + quitina con un costo de ₡14.872,85. El costo de los medios restantes oscila entre ₡8.005,69 y ₡9.807,09 por litro.

Tabla 1. Costos de los medios de cultivo evaluados. Laboratorio de Fitoprotección, INTA. Agosto 2019.

Tratamiento	Costo/litro (₡)	
	Medios Líquidos	Medios Sólidos
PDA	4 959,65	8 155,57
SDA	5 977,65	9 173,57
Medio E	5 482,59	9 203,74
Medio H + quitina	11 643,70	14 872,85
Medio H + quitosano	5 793,70	9 022,85
Medio H1 (JLR)	5 150,10	6 509,64
Medio H2 (X L)	5 745,53	8 974,68
Glucosa + maltosa	11 036,04	15 088,50
Papa + zanahoria	6 627,78	9 807,09
Papa + zanahoria + quitina	11 668,42	18 144,35
Jugo de vegetales (V8)	5 557,62	7 802,76
Testigo (agar-agua)	7 236,55	8 005,69

En la tabla 2 se muestra la cantidad de blastosporas y de conidios en un mililitro de agua.

Tabla 2. Producción de Blastosporas (11 días) y concentración de conidios en cada tratamiento. (Revisar este título)

Medio de cultivo	Producción de blastosporas/mL a los 11 días	Concentración de conidios en los medios solidos
Agar papa dextrosa (PDA)	1,1X10 ⁷ b	2,4X10 ⁶
Saboroud papa agar (SDA)	1,1X10 ⁷ b	8X10 ⁵
Medio E	6,7X10 ⁷ a	1X10 ⁶
Medio H + quitina	2,3X10 ⁷ b	1,3X10 ⁶
Medio H + quitosano	2,4X10 ⁷ b	3,2X10 ⁷
Medio H1	4,7X10 ⁷ b	1X10 ⁶
Medio H2	2,11X10 ⁷ b	1X10 ⁶
Glucosa-maltosa	2,9X10 ⁷ b	1X10 ⁶
Papa + zanahoria	1,0X10 ⁷ b	1X10 ⁶
Papa + zanahoria + quitina	9,7X10 ⁵ c	1X10 ⁶
Jugo de vegetales (V8):	4,7X10 ⁶ c	8X10 ⁵
Testigo relativo	8,3X10 ³ c	5X10 ⁴

Se asumió hipotéticamente una concentración por mililitro de 1×10^6 *blastosporas* o conidios para combatir el ácaro *S. pinki* en arroz comercial (Rosas y Sampedro, 2006). Para una adecuada aplicación se recomienda 200 litros por hectárea lo que equivale a 2×10^{11} *blastosporas* o conidios por Hectárea. A partir de la producción (tabla 2) se estimó la cantidad de caldo de concentración necesaria para alcanzar la dosis suscrita en cada tratamiento, y con ello estimar los costos por hectárea de la aplicación de cada tratamiento.

El medio líquido que hace que la aplicación sea más barata es el medio E con una dosis de 200 l/ha a un costo de \$ 16 365,95. Mientras que el medio sólido más barata es el medio H + quitosano a una dosis de 6,25 l/ha con un costo de \$ 56 392,79 (tabla 3).

Por lo tanto, para un programa de control integrado con estos dos medios se recomienda que el caldo de concentración del microorganismo sea utilizado en concentraciones del orden de 11×10^7 blastosporas o conidios /mL o de 50 g/L de micelio), en caso de una baja producción de conidios.