

**UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**  
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DEL MEDIO DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae* cepa BISA 01-2000  
TESIS DE GRADO

**JOSÉ RICARDO VILLATORO ESPINOZA**  
CARNET 20345-07

ESCUINTLA, SEPTIEMBRE DE 2014  
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

**UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**  
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES

EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DEL MEDIO DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae* cepa BISA 01-2000  
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR  
**JOSÉ RICARDO VILLATORO ESPINOZA**

PREVIO A CONFERÍRSELE  
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES EN EL GRADO  
ACADÉMICO DE LICENCIADO

ESCUINTLA, SEPTIEMBRE DE 2014  
SEDE REGIONAL DE ESCUINTLA

## **AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR**

RECTOR: P. EDUARDO VALDES BARRIA, S. J.  
VICERECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO  
VICERECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: DR. CARLOS RAFAEL CABARRÚS PELLECCER, S. J.  
VICERECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, S. J.  
VICERECTOR ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS  
SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA BELTRANENA DE LORENZANA

## **AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS**

DECANO: DR. ADOLFO OTTONIEL MONTERROSO RIVAS  
VICEDECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ  
SECRETARIA: ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES  
DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. LUIS MOISÉS PEÑATE MUNGUÍA

**NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**  
ING. JOSÉ MIGUEL LEMUS GRIJALVA

**TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN**  
DRA. MARÍA ANTONIETA ALFARO VILLATORO  
MGTR. ADÁN OBISPO RODAS CIFUENTES  
MGTR. EMERSON OMAR HERRERA JUÁREZ

Guatemala, 03 de julio de 2014

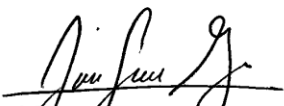
Señores  
Miembros del Consejo  
Facultad de Ciencias  
Ambientales y Agrícolas  
Universidad Rafael Landívar  
Ciudad de Guatemala

Respetables Miembros del Consejo

Por este medio me dirijo a ustedes para informarles que he asesorado el trabajo de tesis del estudiante JOSE RICARDO VILLATORO ESPINOZA, titulado "EVALUACIÓN DE SEIS VOLUMENES DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO, PARA LA PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS Y CONIDIOS DE LA CEPA BISA 01-2000 DE *Metarhizium anisopliae*.

El trabajo reúne los requisitos académicos establecidos por la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas de la Universidad Rafael Landívar, como informe técnico profesional, por lo que recomiendo que el mismo sea aprobado.

Atentamente,

  
Ing. José Miguel Lemus Grijalva  
Jefe de Plagas y Enfermedades  
Ingenio La Unión S. A.



Universidad  
Rafael Landívar  
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
No. 06170-2014

### Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante JOSÉ RICARDO VILLATORO ESPINOZA, Carnet 20345-07 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES; de la Sede de Escuintla, que consta en el Acta No. 0655-2014 de fecha 27 de agosto de 2014, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DEL MEDIO DE CULTIVO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae* cepa BISA 01-2000

Previo a conferírsele el título de INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN CULTIVOS TROPICALES en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 22 días del mes de septiembre del año 2014.

  
ING. REGINA CASTAÑEDA FUENTES, SECRETARIA  
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS  
Universidad Rafael Landívar



## DEDICATORIA

**A**

<b>DIOS:</b> meta	Por darme las facultades y perseverancia para alcanzar esta meta
<b>A MIS PADRES:</b>	José Antonio Villatoro Arreaga Aura Violeta Espinoza Lezana
<b>A MI HERMANA:</b>	Ana Lucía
<b>A MIS TIAS:</b>	Elsa Leticia Espinoza Lezana María Julieta Espinoza Lezana
<b>A MI FAMILIA:</b>	Abuelos, tíos, tías, primos y primas
<b>A MIS AMIGOS:</b>	Por todo el apoyo incondicional
<b>A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN:</b>	Por todo el compañerismo recibido
<b>A MIS AMIGOS Y EX COMPAÑEROS DE INGENIO LA UNION S. A.</b>	Ing. Victor Hugo Motta Ponciano Ing. José Miguel Lemus Grijalva Ing. Luis Guillermo González Paredes Agr. Julio Constantino Velásquez Acevedo Ing. Cesar Martínez Torres
<b>A LAS INSTITUCIONES EDUCATIVAS</b>	Colegio Parroquial María Auxiliadora Instituto Tecnológico Proesur Universidad Rafael Landívar
<b>A INGENIO LA UNION</b>	Especialmente al departamento de Agronomía

## **AGRADECIMIENTOS**

**A:**

Dios, por ser parte de su creación

Mis padres, por los principios y valores con los que me han formado

Mi hermana, por todo su cariño y apoyo incondicional

Mis tías, por todo el cariño recibido y el acompañamiento durante mis primeros años de estudio

Mi familia, por todos los momentos compartidos

Mis amigos, por su apoyo también incondicional

Mis compañeros de promoción, por el apoyo brindado a mi persona en las áreas que más se me dificultaron durante la carrera

Mis amigos y ahora ex compañeros de Ingenio La Unión, por todo su apoyo en mi formación académica y laboral

Las Instituciones Educativas donde me formé, por el conocimiento adquirido

Ingenio La Unión S. A., por los años laborados en esta empresa y por el desarrollo profesional alcanzado

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	i
SUMARY.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.2 GENERALIDADES DE LA CHINCHE SALIVOSA.....	3
2.2.1 Clasificación taxonómica y distribución geográfica de la chinche salivosa.....	4
2.2.2 Bio-ecología de la chinche salivosa.....	5
2.2.3 Ciclo biológico y hábitos de la chinche salivosa.....	5
2.3 CONTROL BIOLÓGICO.....	7
2.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	8
2.5 MODOS DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	9
2.6 PRINCIPALES VÍAS DE INFECCIÓN DE LOS AGENTES ENTOMOPATÓGENOS...	10
2.7 GENERALIDADES DE <i>M. anisopliae</i> .....	11
2.7.1 Clasificación sistemática.....	11
2.7.2 Principales características físicas.....	12
2.2.6.3 Cepa.....	12
2.2.7 Producción de <i>M. anisopliae</i> en el Ingenio La Unión S. A.....	13
2.2.7.1 Primera fase (cultivo sumergido).....	13
2.2.7.2 Segunda fase (fermentación del sustrato sólido).....	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
3.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	18
IV. OBJETIVOS.....	20
4.1 GENERAL.....	20
4.2 ESPECÍFICOS.....	20
V. HIPÓTESIS.....	21
VI. METODOLOGÍA.....	22
6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO.....	22
6.1.1 Condiciones climáticas.....	22



	Página
6.1.2 Vías de acceso.....	22
6.1.3 Producción de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	22
6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL.....	23
6.2.1 Preparación de los materiales.....	23
6.3 FACTOR ESTUDIADO.....	24
6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	25
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
6.6 MODELO ESTADÍSTICO.....	25
6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL (UE).....	26
6.8 CROQUIS DEL ESPERIMENTO.....	26
6.9 MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	27
6.10 VARIABLES.....	28
6.11 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	28
6.11.1 Análisis estadístico.....	28
6.11.2 Análisis económico.....	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS.....	29
7.2 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS.....	30
7.3 ANÁLISIS ECONÓMICO.....	32
IX. CONCLUSIONES.....	36
X. RECOMENDACIONES.....	37
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	38
XII. ANEXOS.....	42
12.1 Glosario.....	43

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos evaluados.....	25
Cuadro 2. Croquis del experimento.....	26
Cuadro 3. Determinación de las dosis producidas por cada tratamiento.....	31
Cuadro 4. Análisis de varianza de la producción de conidios por tratamiento.....	31
Cuadro 5. Prueba de medias para la producción de conidios por tratamiento.....	32
Cuadro 6. Insumos requeridos para la preparación de 35 medios líquidos de cultivo.....	33
Cuadro 7. Costo/insumos requeridos para la preparación de un ciclo de agitación.....	33
Cuadro 8. Inóculo producido y bolsas inoculadas por tratamiento por ciclo de agitación...	34
Cuadro 9. Dosis producidas por tratamiento por ciclo de agitación.....	34
Cuadro 10. Relación beneficio/costo (RBC) por tratamiento por ciclo de agitación.....	35
Cuadro 11. Costo de oportunidad de los diferentes tratamientos.....	35
Cuadro 12. Detalle de los insumos utilizados en la producción de <i>M. anisopliae</i> y su costo.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Adultos de la chinche salivosa.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de la chinche salivosa (huevecillos sin diapausa).....	7
Figura 3. Adulto de chinche salivosa parasitado por <i>M. anisopliae</i> .....	11
Figura 4. Producción in vitro de <i>M. anisopliae</i> .....	13
Figura 5. Producción de matrices líquidas de <i>M. anisopliae</i> .....	14
Figura 6. Producción de <i>M. anisopliae</i> en maíz.....	16
Figura 7. Diagrama de producción de <i>M. anisopliae</i> .....	23
Figura 8. Concentración de blastosporas de <i>M. anisopliae</i> en medio de cultivo líquido.....	29
Figura 9. Concentración de conidios de <i>M. anisopliae</i> en granos de maíz quebrantado....	30
Figura 10. Producción de <i>M. anisopliae</i> versus costo por dosis Ingenio La Unión S. A.....	42



# **EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE *Metarhizium anisopliae* cepa BISA 01-2000**

## **RESUMEN**

El trabajo consistió en la evaluación de diferentes niveles de medio de cultivo líquido para la producción comercial de la cepa BISA 01-2000 de *Metarhizium anisopliae*, mediante un sistema de producción bifásico. La evaluación se enfocó en el medio sumergido, para incrementar el nivel de conidios por gramo en la segunda fase de la producción, que es por fermentación del sustrato sólido. Los resultados demostraron que debido a la forma cónica donde se agitan los medios de cultivo, a mayor volumen de medio, se obtiene una menor agitación, lo cual repercute en las concentraciones de las dos estructuras arriba mencionadas, de una forma inversamente proporcional al volumen utilizado, pero también se determinó que el aprovechamiento de la capacidad instalada del laboratorio si está relacionado de forma directamente proporcional al factor volumen. Se concluye que debido a que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento con una mayor rentabilidad por unidad productiva es el número cuatro (700 ml), mientras que si el enfoque es el aprovechamiento de la capacidad instalada del laboratorio, el mejor tratamiento es el número seis (900 ml). Basado en esto, se recomienda utilizar uno de estos tratamientos para la producción comercial del hongo, y a la vez se propone continuar con esta investigación, determinando cuál es el volumen de inóculo por bolsa, en la fermentación del sustrato sólido al cual se obtiene una mayor producción.

**EVALUATION OF VOLUMES OF CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF  
*Metarhizium anisopliae*, BISA 01-2000 strain**

**SUMMARY**

The study consisted of the evaluation of six volumes of liquid culture medium made up of demineralized water, casein peptone, yeast extract, anhydrous glucose, and a dispersing agent for the commercial production of the BISA 01-2000 strain of *Metarhizium anisopliae*, through a two-phase production system. The evaluated treatments were: 400, 500, 600, 700, 800, and 900 ml. The evaluation was focused on the submerged medium to increase the conidium per gram in the second production phase that is based on fermentation of the solid substrata. The response variables were: blastospores per ml, conidia per gram and cost per dose. The results showed that since the vessel used to shake the culture medium is conical, the higher medium volume used results in lower agitation, which affects the inoculated concentrations in an inversely proportional manner to the volume used. It was also determined that using the laboratory's installed capacity is directly proportional to the volume factor. It is concluded that due to significant differences among the treatments, the most profitable treatment per production unit is that of 700 ml, while the best treatment to utilize the laboratory's installed capacity is that of 900 ml. Based on the above, it is recommended to use these treatments for the commercial production of fungus and at the same time it is recommended to carry out further research, determining which is the inoculum volume per bag in the solid substrata fermentation that will allow higher production.

# I. INTRODUCCIÓN

La problemática de los insectos plaga dentro del cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) es de gran importancia económica para la agroindustria azucarera guatemalteca, dentro de los que cabe destacar a la chinche salivosa (*Aeneolamia* sp. y *Prosapia* sp.) como la principal plaga que afecta el follaje, reduciendo con su daño el área fotosintética efectiva de la planta, lo que se ve reflejado en un menor crecimiento de los tallos y por ende en una disminución de la producción de toneladas de caña y azúcar por hectárea.

La fitoprotección juega un papel de suma importancia en el manejo de los cultivos. Dentro de este campo, la implementación del Manejo Integrado de Plagas (MIP) se ha convertido en una de las herramientas más sostenibles para mantener los niveles poblacionales por debajo del nivel de daño económico, con el menor impacto ambiental posible. La necesidad de implementar el MIP en Guatemala se dio a raíz de los problemas con el control de plagas en el cultivo del algodón (*Gossypium herbaceum*) en las décadas de los setenta y ochenta. El MIP está constituido por varios métodos de control (cultural, etológico, biológico, mecánico y el químico como última opción), los cuales realizados de forma oportuna, producen buenos resultados. Dentro del método de control biológico destaca la utilización de parasitoides, depredadores y entomopatógenos.

El hongo *Metarhizium anisopliae* es uno de los biocontroladores más utilizados en Guatemala para el control de plagas en el cultivo de la caña de azúcar, principalmente como se mencionó para el control de la chinche salivosa, que es una de las plagas de mayor importancia económica para su cultivo en el país. La producción de este hongo ha sido uno de los pilares en el control biológico de dicha plaga, sin embargo, a pesar de que en Guatemala se cuenta con una amplia experiencia sobre su producción, dentro de dicho proceso existen áreas deficientes en lo que respecta a investigación, haciendo vulnerable su producción por la falta de información validada.

Uno de esos procesos es la producción de matrices líquidas, éstas consisten en la inoculación con conidio puro de *M. anisopliae* en medio de cultivo líquido contenido en frascos erlenmeyer y la agitación de estos a 160 revoluciones por minuto en agitadores orbitales, que estimulan la

formación de blastosporas, éstas luego se transformarán en micelio y posteriormente en conidios que son las unidades infectivas utilizadas para controlar a los insectos plaga en el campo. Las revoluciones por minuto a las que se somete el medio de cultivo líquido dentro de los frascos erlenmeyer parecieran estar directamente afectadas por el volumen de medio contenido en estos, debido a su forma cónica, haciendo vulnerable el desarrollo y la concentración de blastosporas, lo que será reflejado en la concentración de conidios en el sustrato sólido utilizado en la segunda fase de producción.

La forma cónica de los frascos erlenmeyer es necesaria para evitar derramamientos de medio líquido por la fuerza centrífuga que el agitador orbital ejerce sobre el material, pero esta forma cónica a la vez pareciera que afecta la agitación de forma tal que a medida que se aumenta el volumen dentro de los frascos, disminuye la velocidad de agitación del líquido contenido en su interior.

De lo anterior surgió la propuesta de investigación, en la cual se evaluó la producción de blastosporas y conidios de la cepa BISA 01-2000 de *M. anisopliae*, que es la de mayor importancia en el control de la chinche salivosa en el Ingenio La Unión S. A., en seis diferentes volúmenes de medio de cultivo en la producción de matrices líquidas.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

La caña de azúcar es afectada por varias especies de plagas, lo que constituye uno de los factores más importantes en la disminución de la productividad (Badilla, 2000). La chinche salivosa (*Aeneolamia* sp y *Prosapia* sp) causa graves perjuicios, ya que los adultos se alimentan de las láminas foliares de la caña provocando una fitotoxemia, a causa de la inoculación de enzimas aminolíticas y oxidantes. Esto trae como consecuencia la disminución de la capacidad fotosintética, y producto de esto, el proceso formativo de la sacarosa en el tallo se disminuye, causando pérdidas cuantiosas (Badilla, Toledo y Barreno, 1996).

Para el control de cercópidos en caña de azúcar se han utilizado diferentes estrategias de control; dentro de ellas el hongo *M. anisopliae* se ha utilizado con éxito para el control de adultos de esta plaga en países como Costa Rica, Venezuela, Panamá, Guatemala y Nicaragua (Badilla, 2000).

Según el Comité de Manejo Integrado de Plagas Cañamip (2012), la chinche salivosa es uno de los insectos plaga de mayor importancia económica en el cultivo de la caña de azúcar en Guatemala, reportando para la zafra 2011 - 2012, un total de 2,273 hectáreas dañadas, ocasionando pérdidas por 3,917 toneladas métricas de azúcar.

### 2.2 GENERALIDADES DE LA CHINCHE SALIVOSA

Según Salazar (1990), *Aeneolamia* es el género que comprende la mayoría de insectos conocidos como salivasos (cercópidos), los cuales causan grandes daños a la caña de azúcar. Las especies de este género se pueden desarrollar sobre pastos, malezas gramíneas, además de la caña. Estos cercópidos se encuentran desde los 10 metros sobre el nivel del mar (msnm) hasta los 1700 msnm, mientras que Salguero (2008) indica que se encuentra desde los 0 hasta los 3000 msnm. Los cercópidos tienen en común la característica de alimentarse en su estado adulto de las láminas foliares de la caña de azúcar, inyectándoles tóxicos oxidativos que obstruyen los haces vasculares, provocando fitotoxemia causada por la inoculación de enzimas

aminolíticas y oxidantes, así como aminoácidos. Este estado patológico se presenta después de pocos días, con la aparición de manchas lineales cloróticas, las que paulatinamente se tornan amarillas y luego necróticas (Salazar, 1990).

### 2.2.1 Clasificación taxonómica y distribución geográfica de la chinche salivosa

La clasificación taxonómica de la chinche salivosa, consultada en el portal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala es la siguiente (Anónimo, 2013):

Reino..... Animal  
Phylum..... Arthropoda  
Clase..... Insecta  
Subclase..... Pterygota  
División..... Exopterigota  
Orden..... Hemíptera  
Suborden..... Auchenorrhyncha  
Superfamilia... Cercopideae  
Familia..... Cercopidae  
Subfamilia..... Tomaspidinae  
Género..... *Aeneolamia*  
Especie..... *postica*

Según Villacorta citado por Camo (1999), las especies del género *Aeneolamia* se encuentran en América Central y en toda la región oriental de América del Sur y son las que presentan la distribución más amplia y la mayor importancia en Venezuela, Las Guyanas y América Central. En Brasil predominan las especies de los géneros *Deois*, *Zulia* y *Mahanarva*, en tanto que el género *Prosapia* está limitado a los países de América Central (Figura 1).



Figura 1. Adultos de la chinche salivosa

### 2.2.2 Bio-ecología de la chinche salivosa

Según Peck (2001) citado por Salguero (2008), la chinche salivosa, salivita, salivazo o mosca pinta (*Aeneolamia* sp y *Prosapia* sp) como también se le conoce, es un insecto con aparato bucal picador-chupador que se alimenta de la savia de gran diversidad de gramíneas tropicales. Es posible encontrar diversas especies nativas que por su daño se han convertido en una plaga de importancia económica de gramíneas forrajeras, caña de azúcar, maíz y sorgo.

### 2.2.3 Ciclo biológico y hábitos de la chinche salivosa

Según Camo (1999), la chinche salivosa es un insecto con tipo de metamorfosis hemimetábola pasando por las siguientes etapas:

- **Estado de huevo:** Son de forma oval, de color amarillo o crema, tardan en incubar de 18 a 26 días, eclosionan cuando empiezan las lluvias, por lo que la humedad relativa y la temperatura influyen mucho en su eclosión.

Al transcurrir cinco días de incubación aparecen cuatro manchas rojizas: dos de ellas aparecen cerca del polo anterior más agudo y corresponden a los ojos del embrión, las otras dos manchas se sitúan cerca del polo posterior y corresponden a los tubos de Malpighi. Progresivamente se va desarrollando una sutura o mancha negra a partir del

polo anterior, la cual avanza en forma longitudinal hasta la parte media del huevo, por esta estructura conocida con el nombre de opérculo, emerge la ninfa en el momento de la eclosión (Camo, 1999).

Diapausa: se realiza en estado de huevo, la fijación es en gran parte genética y en parte una influencia externa sobre la hembra cuando pone los huevos. Esta influencia probablemente es en parte micro-ambiental y en parte debido a factores químicos en el jugo de las hojas de la caña. La diapausa puede durar de 15 hasta 225 días y ser muy variable en cuanto a duración y composición dentro de cada lote de huevos producidos por las hembras y en diferentes épocas del año. Puede ser que probablemente sea influido por el fotoperiodo, posiblemente por el estado de madurez de la caña, la cual cambia la combinación de aminoácidos en la savia de la caña, ingerida por las hembras (Camo, 1999).

- **Estado de ninfa:** La ninfa provoca un daño leve, atacando principalmente la raíz, chupando su jugo. Estas se cubren de una sustancia espumosa que secretan por el extremo anal, lo que las protege y cubre con una sustancia espumosa. Las ninfas se caracterizan por la segregación de saliva o espuma que les da su nombre característico. Este líquido protege al insecto de la desecación. Es secretado por los tubos de malpighi y las burbujas son sopladas por una cámara de aire ventral. El fluido contiene amilasa, invertasa, fenolasa y se estima que más del 90% está constituido por proteína. El cuerpo de la ninfa es amarillo y la cabeza rojiza, pero a medida que van creciendo cambian a cremoso con una zona rojiza a los lados del abdomen. Cuando completan su desarrollo llegan a medir de 6 a 8 mm de largo, terminando éste a las 3 o 4 semanas, habiendo pasado por 5 estadios ninfales que se diferencian entre sí por el tamaño del cuerpo y ancho de la cabeza (Camo, 1999).
- **Estado adulto:** El insecto es volador siendo su principal forma de movilizarse, es de hábito nocturno, que durante el día pasa escondido en las partes bajas de la planta donde hay sombra y buena humedad. El macho adulto mide de 6 a 8 mm de largo y la hembra de 8 a 9 mm y 4 a 6 mm de ancho. El cuerpo tiene forma oval, es café, casi negro, el cual posee dos franjas que van desde amarillo-blanquecino a amarillo sobre las alas anteriores, estas coloraciones son características de *Aeneolamia* spp. Los adultos

tienen una longevidad que va desde los 6 hasta los 9 días, empezando a copular a los dos días de haber emergido del estado ninfal. Poco después la hembra empezará a poner los huevos que eclosionarán a los 10 o 20 días para dar origen a otra generación. En la estación lluviosa se producen de 4 a 5 generaciones. Las hembras de la última generación ponen los huevos que eclosionarán a los 5 o 7 meses. La cópula de la chinche salivosa tiene lugar en las axilas de las hojas y puede ocurrir durante el día o la noche. Esto solo se da un día después de la emergencia y los huevos son depositados 2 o 3 días más tarde. La duración del estado adulto, en condiciones de laboratorio en Guatemala, es de 6 a 8 días aproximadamente, Camo, (1999). Como puede verse en la figura 2 (CENICANA , Anónimo, 2014).



Figura 2. Ciclo de vida de la chinche salivosa (huevecillos sin diapausa)

### 2.3 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico es definido por Flores (2007), como el control ejercido por organismos vivos que se comportan como parásitos de otros catalogados como plagas. El ser humano los produce artificialmente, y los libera en los campos infestados, tratando que se colonicen y se reproduzcan por sí mismos.

## 2.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos o HEP según Devoto, Geraldin y France (2003), se conocen desde que el hombre utiliza insectos para su beneficio, como el gusano de seda y las abejas. Sin embargo, el rápido desarrollo de una agricultura altamente demandante de insumos, requería de productos de fácil disponibilidad y de efecto inmediato, características que cumplían los insecticidas sintéticos. Los organismos entomopatógenos, entonces, fueron desplazados debido a la falta de conocimiento sobre la interacción entre el patógeno, su huésped y el ambiente. El interés hacia esta área se renovó a medida que se fueron demostrando los efectos negativos que tienen los insecticidas sintéticos en la salud de las personas y en la calidad del entorno. Algunas de las ventajas de los HEP son:

- Especificidad: parasitan sólo una especie o un grupo de especies muy relacionadas, sin afectar especies que no son plaga ni a los enemigos naturales.
- Persistencia: si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para parasitar a su hospedero, se reproduce y renueva en forma continua, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
- Compatibilidad: se pueden aplicar mezclas de HEP o bien, combinaciones de entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas para lograr efectos superiores a los logrados con aplicaciones por separado de cada producto.
- Inocuidad ambiental: no contaminan el medioambiente ni afectan al hombre y otros animales superiores.

Según Devoto et al (2003), algunas de las desventajas que han limitado el desarrollo de esta técnica en años pasados son:

- Factores ambientales: son sensibles a temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).

- **Almacenamiento:** requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas.
- **Menor velocidad de acción:** en general, los biopesticidas no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente, sin embargo, el insecto deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

## 2.5 MODOS DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Según Alves (1986) de manera general presentan las siguientes fases de desarrollo sobre los hospederos:

- **Germinación:** encontrando condiciones favorables de humedad y temperatura el hongo germina sobre el insecto produciendo un tubo germinativo, lo cual ocurre en un mínimo de 12 horas a una temperatura de 23 a 30 °C y humedad relativa más o menos elevada.
- **Formación de apresorios:** en la extremidad del tubo germinativo ocurre una dilatación de hifas formando una estructura denominada apresorio.
- **Formación de grampa de penetración:** en la parte inferior del apresorio aparece la formación de una estructura punteada, la cual penetra la epicutícula y procutícula del insecto. No todos los hongos presenta esta estructura.
- **Penetración:** se involucran dos procesos principales: uno físico debido a la presión de las hifas que rompen las áreas membranosas o esclerosadas y un químico, resultado de la elaboración de enzimas que facilitan la penetración mecánica en el área de la procutícula aparecen síntomas de histólisis (descomposición de tejido por acción enzimática).
- **Colonización:** a partir de la penetración inicial se da el proceso de colonización del hospedero por el hongo. Las hifas que penetran sufren un engrosamiento y se ramifican,

inicialmente por el tegumento del insecto y posteriormente en la cavidad general del cuerpo, a partir de ese momento se forman las colonias del hongo y otros cuerpos hifales, antes de la muerte del insecto. Después de la muerte del insecto el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por las hifas filamentosas, más no ocurre la desintegración del insecto, ya que éste segrega sustancias antibacterianas. El tiempo de colonización puede variar entre 76 a 120 horas dependiendo del insecto, el patógeno y las condiciones ambientales.

- **Reproducción del patógeno:** 48 a 60 horas después de la muerte del insecto, que ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación, las hifas comienzan a emerger por las partes más frágiles y luego la cutícula utilizando la presión mecánica (la boca, el ano, las regiones intersegmentales y tarsos, son las áreas de salida del hongo). La producción de conidios ocurre entre 24 y 48 horas después de la emergencia de las hifas, bajo condiciones de elevada humedad y temperaturas entre 20 a 30 °C, (dependiendo del patógeno).

## **2.6 PRINCIPALES VÍAS DE INFECCIÓN DE LOS AGENTES ENTOMOPATÓGENOS**

Según la National Academy of Science (1987), las principales vías de infección de los entomopatógenos son:

- **Oral:** ingerido con el alimento. Principalmente virus, rickettsias, bacterias, nemátodos, protozoarios y algunos hongos.
- **A través del tegumento íntegro o tráquea.** Principalmente hongos y algunos nemátodos.
- **Parenteral.** Invasión por mordedura o lesión al tegumento del insecto.
- **A través del huevo.** Ya sea adentro o por encima. Principalmente virus, rickettsias, espiroquetas y protozoarios.



## 2.7 GENERALIDADES DE *M. anisopliae*

De acuerdo a Rodríguez (1993), Metchnikov en el año de 1879 señaló al hongo por primera vez, siendo Sorokin (1879) quien instituyó el género *Metarhizium*. Fue Hart el primer investigador que encontró *Metarhizium* parasitando *Aeneolamia* sp. Las primeras técnicas de cultivo de *Metarhizium* a gran escala fueron desarrolladas en el instituto ucraniano de protección de plantas, Kiev, URSS. Fue el primer hongo utilizado en la lucha biológica contra insectos dañinos (Alves, 1986). En CODECAP (Brasil) se inició la multiplicación comercial del hongo. Rodríguez (1993) indica que la información generada en Brasil sobre la producción masiva del hongo ha servido para que diversos países tengan producciones a nivel semicomercial.



Figura 3. Adulto de chinche salivosa parasitado por *M. anisopliae*

### 2.7.1 Clasificación sistemática

Según Soto (2008), la clasificación sistémica de *M. anisopliae* es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyphomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *anisopliae*

### **2.7.2 Principales características físicas**

Bernal, Bustillo y Posada (1994), indican que el hongo se caracteriza por presentar conidióforos que forman capas de esporas, las cuales se producen en cadenas basipétalas compactas en columnas, de forma ovoide a cilíndrica y unicelulares. Los conidios son uninucleados, alargados, de color verde, formando usualmente un solo tubo germinativo en el área polar. Presentan una pigmentación verde y su tamaño diferencia a las especies. El micelio es hialino y los conidióforos sencillos o ramificados. Se ha observado buen crecimiento del hongo en medios artificiales orgánicos e inorgánicos; principalmente en PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y medios de arroz. La rapidez de reproducción del hongo (mayor a la del insecto) imposibilita que se desarrolle resistencia al hongo. El hongo se encuentra en forma saprofítica en el suelo y como parásito en insectos.

*M. anisopliae* es un hongo con un amplio rango de hospederos, para 1975 se tenía reportado que podía atacar más de 204 especies de insectos (Alves, Risco, Silveria, Machado, 1984). Toledo y Badilla (1996) mencionan que la selección de razas es fundamental para el desarrollo de un buen programa, debido a que este entomopatógeno presenta diferencias marcadas de patogenicidad y virulencia entre aislamientos de una determinada especie, lo cual ha sido demostrado por varios autores. Debido al bajo impacto que produce en el ambiente, durante los últimos años se ha ido incrementando el uso del hongo *M. anisopliae*, como parte del manejo integrado de plagas, por sus características patogénicas amplias, su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso, lo cual representa una alternativa viable para el combate de plagas en algunas regiones cañeras (Rodríguez, Rodríguez, Riestra, Villanueva, Rodríguez, 2002).

**2.2.6.3 Cepa:** según Agrios y Hebert (1982), es el nombre que se le da a la progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro, de un hongo para este caso.

### 2.2.7 Producción de *M. anisopliae* en el Ingenio La Unión S. A.

La producción se realiza en forma bifásica (dos fases) para incrementar la capacidad de producción del laboratorio. La primera fase contempla la reproducción *in vitro* de la cepa del hongo (figura 4) hasta la etapa de cultivo sumergido (matrices líquidas) y la segunda, la etapa de la fermentación del sustrato sólido, donde la producción de conidios se hace a gran escala. A continuación se describe con detalle cada uno de los procesos (V. Motta, 2012, comunicación personal)

**2.2.7.1 Primera fase (cultivo sumergido):** esta etapa está compuesta por los siguientes procesos:

- **RevigORIZACIÓN:** es un proceso anual que consiste en inocular insectos de la plaga en sus tres estados (huevo, ninfa y adulto) para mantener alta la patogenicidad de la cepa. Los insectos que resulten muertos por el hongo, son lavados y colocados en cámaras húmedas para su esporulación, luego se realiza una prueba de compatibilidad (siembra de una colonia de la cepa actual y una de la anterior en la misma caja petri con medio de haba para cerciorarse que se trata de la misma cepa) y finalmente se aísla la cepa en sílica gel para su preservación.
- **Producción *in vitro*:** comprende la reproducción del hongo aislado en sílica gel por medio de la siembra y clonación de colonias en medio de cultivo de haba, hasta un máximo de cuatro clonaciones para mantener alta la patogenicidad del hongo, las placas esporuladas son raspadas con un asa, el conidio es secado y guardado para la siembra de matrices líquidas.



Figura 4. Producción *in vitro* de *M. anisopliae*

- Matrices líquidas: el medio de cultivo líquido es inoculado con conidio puro para la obtención de blastosporas, duplicando la capacidad de producción comparado con una producción monofásica (sin cultivo sumergido). La concentración de blastosporas se determina realizando conteos de estas estructuras en una cámara Neubauer. Los medios inoculados son puestos en agitación durante 72 horas en agitadores orbitales (figura 5).

Según Roberts y Sweeney (1982) citados por Leucona (1996), los hyphomycetes generalmente no producen conidios en cultivo sumergido, a pesar de crecer y rendir abundante cantidad de blastosporas. Estas blastosporas son fragmentos de micelio de pared delgada y aspectos levaduriforme, las cuales, si bien resultan infectivas tienen un tiempo de vida medio corto y no soportan condiciones ambientales extremas, en la misma magnitud que lo hacen los conidios.



Figura 5. Producción de matrices líquidas de *M. anisopliae*

**2.2.7.2 Segunda fase (fermentación del sustrato sólido):** esta etapa comprende básicamente tres procesos, los cuales son:

- Preparación del sustrato sólido (maíz): sumergir 29 kilogramos de maíz amarillo quebrantado durante seis horas en 40 litros de agua filtrada y clorinada, posteriormente de

cumplido el tiempo de inmersión, retirar el exceso de humedad escurriendo el sustrato en una zaranda. Luego se procede a embolsar a razón de 350 gramos/bolsa de polipropileno, estas bolsas se someterán al proceso de esterilización en una autoclave (132 °C y 241 kilo Pascales) durante 60 minutos. Al finalizar el ciclo de esterilización, las bolsas son enfriadas y preparadas para la inoculación.

- Inoculación: las bolsas esterilizadas y enfriadas a una temperatura menor a 30 °C son inoculadas dentro de una cámara de flujo laminar, con un volumen de 18 cc del medio proveniente de las matrices líquidas.
- Desarrollo y secado: las bolsas inoculadas son puestas en incubación a una temperatura de 28 °C, una humedad relativa de 60-70% y un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad durante un período de 10-14 días, dándole movimiento al sustrato sólido cada cuatro días para romper el micelio y oxigenarlo. Posteriormente las bolsas son enviadas a secado, donde se rompen y el hongo se coloca en bandejas con la finalidad de reducir su contenido de humedad hasta el 17%, previo a su almacenamiento. La temperatura, humedad y fotoperíodo al que se somete el material en las salas de secado son prácticamente las mismas que en las salas de desarrollo.

Según Alves (1986) citado por Leucona (1996), generalmente la producción de *M. anisopliae* se basa en la fermentación de granos de arroz descascarados sin pulir, sobre este sustrato es común obtener rendimientos que van del 10 al 12% en masa fúngica, lo que equivale aproximadamente a  $10^9$  conidios/g de arroz.



Figura 6. Producción de *M. anisopliae* en maíz

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La producción de matrices líquidas es uno de los procesos claves dentro de la producción comercial de *Metarhizium anisopliae*, ésta se lleva a cabo dentro de la primera fase de producción, llamada cultivo sumergido, en este proceso se producen blastosporas mediante la inoculación de conidio puro al medio de cultivo líquido, este medio es sometido posteriormente a determinadas condiciones para estimular la producción de dichas estructuras. De la concentración lograda de estas estructuras depende directamente la concentración de conidios por gramo en la segunda fase de producción, llamada fermentación de sustrato sólido. Mientras mayor sea la concentración de blastosporas en las matrices líquidas, mayor será la concentración de conidios por gramo en el sustrato sólido, aumentando la capacidad de producción y disminuyendo los costos.

La producción del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* se realiza en forma bifásica para favorecer la rápida colonización del sustrato sólido de cultivo e incrementar la capacidad de producción, mediante la producción de blastosporas en medios líquidos de cultivo (primera fase) previo a su inoculación en bolsas con sustrato sólido (segunda fase). Esta primera fase favorece la rápida colonización del sustrato sólido por parte del hongo, aumentando la eficiencia de producción de conidios (unidades infectivas del hongo) al incrementar la presión de inóculo sobre el sustrato y ejercer mayor presión sobre los competidores (otros hongos y/o bacterias) que hayan sobrevivido al proceso de esterilización en autoclave, evitando o minimizando su expresión en el sustrato.

La agitación se realiza con la finalidad de oxigenar el medio de cultivo, la concentración de blastosporas por mililitro disminuye conforme se incrementa el volumen de medio dentro de los frascos erlenmeyer, hasta acercarse a un litro, afectando la producción al disminuir la presión de inóculo sobre los competidores como se mencionó anteriormente y de igual manera en la concentración de conidios por gramo.

Actualmente se utiliza el volumen de 800 ml en la producción de matrices líquidas, pero se ha observado que al aumentar el volumen, disminuye la concentración de blastosporas y de igual forma, aumenta la concentración al disminuir el volumen, siempre manteniendo la relación de 0.8 gramos de conidio puro por litro de medio de cultivo o su proporción.

### **3.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

*M. anisopliae* representa en la actualidad uno de los medios de control biológico de insectos plaga más efectivos, con una respuesta rápida y con un efecto prolongado, debido a la epizootia que se produce en los campos de cultivo, además de ser seguro para el personal que interviene tanto en su producción y aplicación, así como también para la fauna que habita en los agroecosistemas. Para mantener su producción económicamente viable se hace necesaria la validación de metodologías que faciliten y estabilicen su producción. La determinación del volumen al que mejor responde el desarrollo de blastosporas en la preparación de matrices líquidas permitirá obtener una mayor concentración de estas estructuras (blastosporas) en el medio líquido de cultivo.

La producción anual de *M. anisopliae* en el Ingenio La Unión S. A. oscila entre 20,000 y 30,000 dosis, cada una de  $5 \times 10^{12}$  conidios, dependiendo del historial de área endémica y las condiciones climáticas propias para cada año. El precio actual en el mercado de una dosis oscila alrededor de US\$ 12.00. El costo de producción en el Ingenio La Unión S. A. es de alrededor de US\$ 5.00, una cantidad significativamente menor. La producción de *M. anisopliae* le representa a la empresa un ahorro anual de entre US\$ 140,000 a US\$ 210,000 en la compra de insecticida.

La concentración de conidios por gramo en la producción comercial (sustrato arroz o maíz) es proporcional a la concentración de blastosporas en las matrices líquidas, produciendo concentraciones hasta 25% menores los lotes inoculados con una menor concentración de blastosporas por ml, respecto a lotes inoculados con una mayor concentración, poniendo en riesgo el ahorro de entre US\$ 35,000 y US\$ 52,500 por año, esto sin tomar en cuenta las pérdidas ocasionadas por la mayor presencia de contaminantes en la producción.



La finalidad de esta investigación fue identificar un tratamiento que permita obtener la mayor concentración de conidios por gramo, para incrementar la capacidad de producción del laboratorio, con lo cual se podría obtener mayor cantidad de dosis por kilogramo de maíz utilizado.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Evaluar el efecto de seis volúmenes de medio de cultivo, en las matrices líquidas, para la producción de blastosporas del hongo *Metarhizium anisopliae*.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar el volumen de medio de cultivo líquido que presente una mayor concentración de blastosporas por ml del hongo *Metarhizium anisopliae*.
- Determinar el impacto de cada tratamiento en la capacidad de producción de *Metarhizium anisopliae* en cantidad de conidios por gramo de maíz.
- Determinar el impacto de cada tratamiento en los costos de producción de *M. anisopliae*.

## V. HIPÓTESIS

- En al menos uno de los tratamientos a evaluar, la producción de blastosporas será mayor.
- Al menos uno de los tratamientos a evaluar presenta una mayor producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* por gramo de maíz.
- En al menos uno de los tratamientos se obtiene una reducción considerable respecto a los demás en el costo de producción.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO

El laboratorio de hongos entomopatógenos del Ingenio La Unión S. A. se encuentra ubicado en el casco de la finca Belén, km 102.5 carretera a la aldea Cerro Colorado, jurisdicción de Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla, 14° 16' 30" latitud norte, 91° 05' 30" longitud oeste, a una altitud de 146 msnm. De acuerdo a la zonificación ecológica de Holdridge, el área está enmarcada dentro de la zona tropical húmeda (Salguero, 2008).

Dentro del laboratorio de producción de *M. anisopliae* del Ingenio La Unión S. A. se cuenta con condiciones controladas para la producción de entomopatógenos.

#### 6.1.1 Condiciones climáticas

La temperatura media anual en la finca Belén es de 26 °C (máxima media anual de 33 °C y mínima media anual de 20 °C). La precipitación pluvial media anual es de 2900 mm distribuidos en 153 días por año, principalmente en los meses de mayo a octubre.

#### 6.1.2 Vías de acceso

Existen dos accesos, ambos por la carretera a la aldea Cerro Colorado, el principal en el desvío sobre el km 94 y el segundo sobre el km 102.

#### 6.1.3 Producción de *Metarhizium anisopliae*

En la figura siete se puede observar el diagrama de producción del hongo:

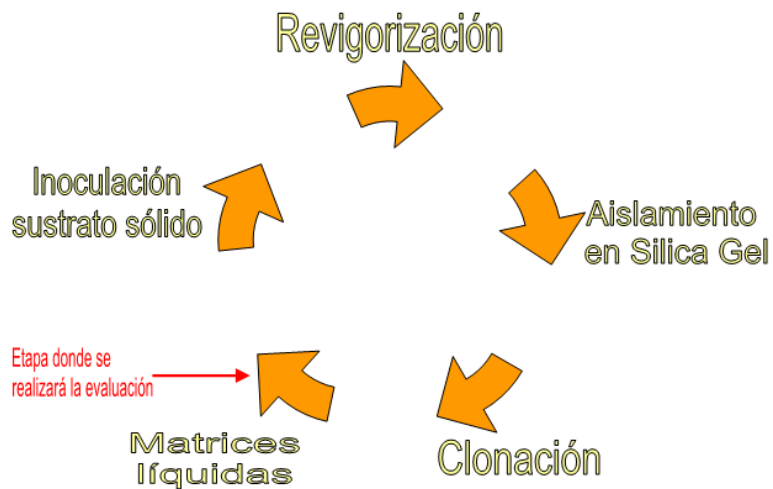


Figura 7. Diagrama de producción de *M. anisopliae*

## 6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

El material utilizado en la evaluación fueron medios de cultivo líquido y conidios de la cepa Bisa 01-2000 de *M. anisopliae*.

### 6.2.1 Preparación de los materiales

La preparación de los materiales para la evaluación inició con la producción de conidio puro, sembrando los conidios de la cepa en medio de haba, en cajas petri. Estas fueron incubadas durante 12 días a 28 °C y un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Las placas se revisaron día a día y las que presentaron contaminación fueron descartadas, el condensado acumulado en las tapas (producto de la transpiración del hongo) fue secado con paños estériles dentro de la cámara de flujo laminar, cada vez que fue necesario, para evitar que este cayera sobre el medio de cultivo, evitando la proliferación de bacterias.

Al finalizar el período de incubación, las placas fueron revisadas en el estereoscopio dentro de la cámara de flujo laminar, las que se encontraron libres de contaminación fueron raspadas para separar el conidio del medio de cultivo. El conidio raspado se depositó en cajas petri previamente esterilizadas durante 20 minutos en la autoclave (132 °C y 241 kilo pascal) y colocadas posteriormente dentro de la cámara incubadora hasta que su contenido de humedad bajó al 17%. Se le tomó a cada caja Petri una muestra con un asa estéril y se colocó a

desarrollar sobre medio de PDA durante 10 días para certificar el material, descartando las que presentaron contaminantes.

Se prepararon 48 medios líquidos de 750 ml utilizando para ello los siguientes productos en las siguientes concentraciones por litro:

- Peptona de caseína = 2.5 g
- Extracto de levadura = 10.0 g
- Glucosa anhidra = 22.0 g
- Agua desmineralizada estéril con dispersante Tween 80 al 0.05%

Para preparar un medio líquido de cultivo se agregaron las cantidades de reactivo indicadas anteriormente a un frasco erlenmeyer y luego se aforó hasta llegar a un litro, se agitó manualmente para disolver los reactivos y se tapó con una película de polipropileno, un tapón de gasa y algodón y finalmente con un tapón de papel aluminio. Para los medios en la evaluación se utilizó proporcionalmente lo necesario de reactivos para el volumen a utilizar para cada tratamiento, siguiendo el mismo procedimiento. Posteriormente estos medios fueron inoculados con conidios del hongo a razón de 0.8 g por litro y sometidos a 160 revoluciones por minuto (rpm) de agitación por 72 horas.

Mientras que para la segunda fase (fermentación del sustrato sólido), la preparación de los materiales consistió en colocar en imbibición una relación de 29 kg de maíz amarillo quebrantado en 40 litros de agua filtrada y clorada. El maíz se dejó reposar durante seis horas, posteriormente se colocó en una zaranda para eliminar el exceso de humedad y se embolsaron en bolsas de polipropileno a razón de 350 g en cada una, estas bolsas se sellaron con un triple doblez y tres grapas, previo a someterlas al proceso de esterilización en autoclave durante 60 minutos a 241 kilo Pascal y 132 °C. Inmediatamente al finalizar el ciclo de esterilización, las bolsas fueron enfriadas en el cuarto frío y cuando su temperatura alcanzó los 30 °C, fueron enviadas a la sala de inoculación.

### 6.3 FACTOR ESTUDIADO

El factor que se evaluó fue el volumen de medio de cultivo líquido.

### 6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Se utilizaron los volúmenes que se indican en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Volumen (ml)	Gramos de conidio puro por medio líquido
T1	400	0.32
T2	500	0.40
T3	600	0.48
T4	700	0.56
T5	800	0.64
T6	900	0.72

La limitante que presentan el volumen de los frascos Erlenmeyer (1000 ml) y los agitadores orbitales que se tienen en el Ingenio La Unión, impiden que se evalúen un número de volúmenes mayores en la misma cantidad a los que son menores al volumen que actualmente se utiliza.

### 6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con seis tratamientos en ocho repeticiones, debido a que por las condiciones controladas del laboratorio no existió ninguna gradiente de variación.

### 6.6 MODELO ESTADÍSTICO

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ij} = \mu + \zeta_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = variable de respuesta de la  $ij$ -ésima unidad experimental

$\mu$  = media general de la variable respuesta

$\zeta_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (nivel del factor) en la variable dependiente

$\epsilon_{ij}$  = error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental

## 6.7 UNIDAD EXPERIMENTAL (UE)

Para la determinación de blastosporas por ml la unidad experimental consistió en una matriz líquida (frasco erlenmeyer), mientras que para la determinación de conidios por gramo la unidad experimental consistió en cuatro bolsas con sustrato sólido (maíz), que es el contenido de una bandeja. El testigo comercial para la determinación de blastospóras por ml fue el volumen de 800 mL, que es el utilizado actualmente en el Ingenio La Unión. De igual forma para la determinación de conidios por gramo el testigo comercial fueron las bolsas inoculadas con las matrices de 800 ml.

## 6.8 CROQUIS DEL EXPERIMENTO

La distribución de las unidades experimentales en la fase de fermentación de sustrato sólido se describe en el cuadro 2 a continuación:

Repeticiones							
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
T5	T1	T6	T3	T1	T2	T4	T1
T2	T5	T3	T1	T4	T6	T1	T4
T3	T2	T3	T1	T5	T6	T4	T2
T5	T4	T1	T3	T5	T2	T4	T2
T1	T3	T2	T5	T4	T3	T5	T4
T6	T2	T5	T6	T3	T6	T6	T6

Las unidades experimentales fueron ordenadas de forma completamente aleatoria.



## 6.9 MANEJO DEL EXPERIMENTO

Los medios líquidos descritos anteriormente fueron sometidos a dos ciclos de esterilización en la autoclave (132 °C y 241 kilo Pascal), cada uno de 60 minutos con 24 horas de separación, inmediatamente después se les redujo la temperatura en el cuarto frío. Después del segundo ciclo de esterilización y su respectivo enfriamiento hasta alcanzar 30 °C, se procedió a sembrarlos con una relación de 0.8 g de conidio puro por litro, utilizando una balanza analítica dentro de la cámara de flujo laminar para pesar el conidio. Los medios sembrados se colocaron en los agitadores orbitales durante 72 horas a 160 rpm. A las 16 horas de agitación se tomó una muestra de cada matriz, utilizando una pipeta graduada y tubos de ensayo estériles y un embolo dentro de la cámara de flujo laminar. La muestra consistió en 5 ml de inóculo, la cual se utilizó para determinar la concentración de blastosporas en las matrices. Cada medio sembrado con conidio puro consistió en una unidad experimental para la evaluación de la concentración de blastosporas por mililitro.

Para determinar la concentración de blastosporas por ml y conidios, cada muestra fue colocada en una cámara de Neubauer y utilizando un microscopio y un contador mecánico se determinaron las concentraciones. Se repitió este procedimiento con cada unidad experimental.

Al tener certificado el inóculo (libre de microorganismos no deseados) se procedió a la inoculación de las bolsas con sustrato sólido, se inocularon utilizando una bomba peristáltica dentro de la cámara de flujo laminar con 18 ml del tratamiento establecido. Se prepararon e inocularon en total 124 bolsas.

Las bolsas inoculadas fueron rotuladas de acuerdo al tratamiento y la repetición a la que pertenecieron para evitar confusiones y la posible pérdida del experimento y fueron colocadas en incubación en las salas de desarrollo a 28 °C, 60% de humedad relativa y fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad por día, durante 12 días. Al finalizar el ciclo de desarrollo las bolsas se enviaron a las salas de secado, donde se rompieron y colocaron en bandejas, a razón de cuatro bolsas por cada una, cada bandeja consistió en una unidad experimental para la evaluación de conidios y dosis producidas. Se le redujo la humedad al hongo hasta alcanzar el 17%, habiendo alcanzado este nivel, se tomó una muestra de 50 g de hongo por unidad experimental (bandeja) para la determinación de la concentración del hongo.

## **6.10 VARIABLES DE RESPUESTA**

Las variables de respuesta fueron:

- Concentración de blastospóras por mL.
- Concentración de conidios por gramo.
- Costo por dosis.

## **6.11 ANÁLISIS DE LA INFORMACION**

### **6.11.1 Análisis estadístico**

Para la primera variable se realizó únicamente una gráfica comparativa con las concentraciones obtenidas. Mientras que a la segunda variable se le realizó un análisis de la varianza. Las diferencias significativas entre los tratamientos, fueron analizadas con prueba de medias de Tukey con una significancia del 95%, para determinar cuál era el mejor tratamiento.

### **6.11.2 Análisis económico**

Después del análisis estadístico se procedió a realizar un análisis económico, para determinar cuál de los tratamientos evaluados generaba una mayor rentabilidad, así como también determinar con cuál de los tratamientos se le podía dar un mejor aprovechamiento a la capacidad instalada del laboratorio.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS

La prueba de producción de blastosporas por mililitro duró 26 días (Figura 8), este período incluyó desde el tiempo de incubación de la propagación in vitro y las primeras 16 horas de agitación de la fase de cultivo sumergido. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en el cuadro 2:

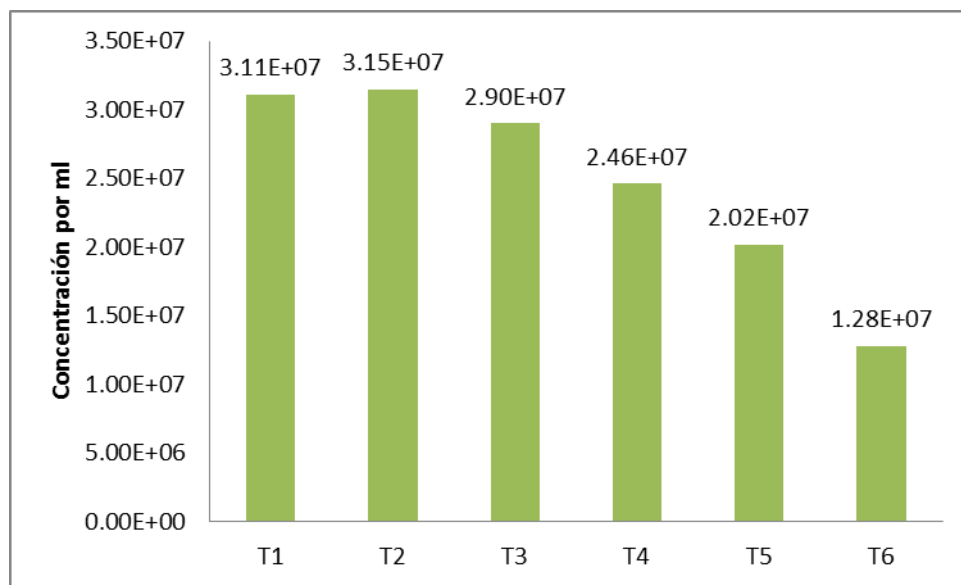


Figura 8. Concentración de blastosporas de *M. anisopliae* en medio de cultivo líquido

Como puede observarse, las concentraciones se ven afectadas de forma inversamente proporcional al incremento en el volumen del medio de cultivo, esto quiere decir que en los tratamientos de mayor volumen, se observa una concentración de blastosporas menor que la obtenida en los tratamientos con un volumen menor. Es importante mencionar que esta variable respuesta se tomó como indicadora, debido a que es de importancia secundaria, esto debido a que las estructuras que realizan el control de insectos plaga en el campo, son los conidios. Por esta razón, a los resultados de esta prueba no se les realizó análisis de la varianza ni prueba de medias, así como tampoco fueron utilizados para la toma de decisiones.

## 7.2 PRODUCCIÓN DE CONIDIOS

La producción de conidios por gramo comprendió la totalidad de tiempo que tardó la evaluación (65 días). Después de obtener los conidios por gramo en la fermentación del sustrato sólido (maíz) y su respectivo proceso de secado, se tomó una muestra de 100 gramos a cada repetición. Estas muestras fueron utilizadas para determinar la concentración de conidios por gramo en cada una de ellas (las repeticiones), de lo cual se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 9.

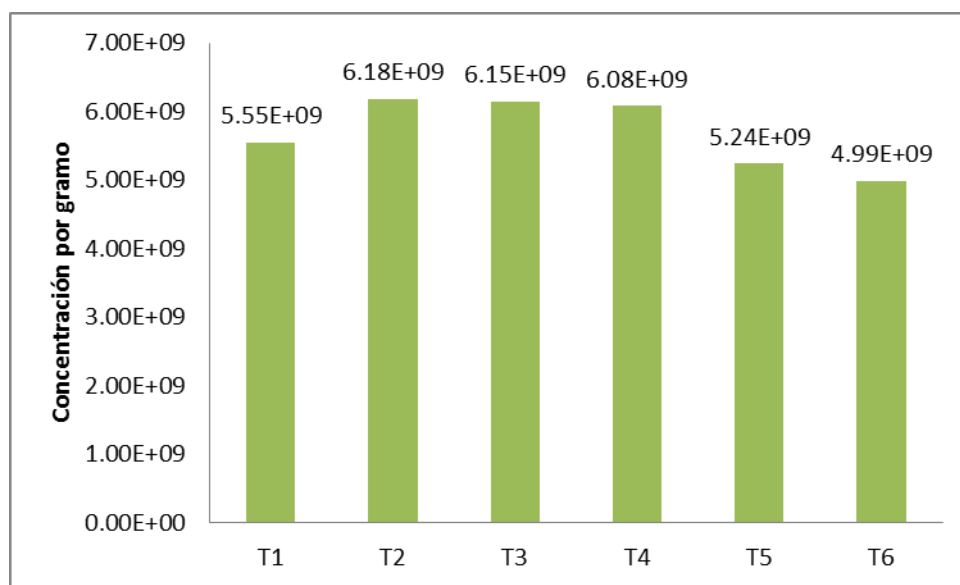


Figura 9. Concentración de conidios de *M. anisopliae* en granos de maíz quebrantado

La figura anterior muestra las producciones que se obtuvieron entre los diferentes tratamientos evaluados. Puede notarse que en la producción de conidios la diferencias en concentración entre los tratamientos evaluados, no es tan marcada como en la concentración de blastosporas por mililitro.

Esta diferencia obtenida entre las concentraciones pudiera estar siendo ocasionada por la ley de rendimientos decrecientes. Esta ley se puede formular de la siguiente manera: a medida que se incrementa la concentración de blastosporas en el inóculo utilizado para iniciar la fermentación del sustrato sólido en la producción de *M. anisopliae*, se aprovecha de mejor

manera los nutrientes contenidos en el maíz, incrementando la concentración de conidios hasta llegar a un punto máximo, después del cual esta última empieza a verse afectada.

Desde otro enfoque, la concentración de blastosporas en el inóculo incrementa la producción de conidios de forma efectiva hasta alcanzar un punto máximo, después del cual, el incremento en la concentración de blastosporas produce un efecto contraproducente en el aprovechamiento de los nutrientes del sustrato sólido, pudiendo ser ocasionado por una sobre saturación de estas estructuras hasta niveles adversos para su óptimo desempeño.

Debido a que la producción del laboratorio se mide con base en dosis producidas, se procedió a calcular la producción de cada tratamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Determinación de las dosis producidas por cada tratamiento

Trat.	Bolsas inoculadas	Conidios/g	Gramos peso seco/Trat.	Conidios/dosis	Dosis producidas
1	24	5.55E+09	218.8	5.00E+12	5.8
2	24	6.18E+09	208.3	5.00E+12	6.2
3	24	6.15E+09	208.3	5.00E+12	6.1
4	24	6.08E+09	212.5	5.00E+12	6.2
5	24	5.24E+09	202.1	5.00E+12	5.1
6	24	4.99E+09	214.6	5.00E+12	5.1

De acuerdo a los datos anteriormente mostrados, se puede observar que los rendimientos en dosis son muy similares, pero como se trata de una cantidad en pequeña escala, se procedió a realizar un análisis de la varianza, para determinar si existían diferencias entre los tratamientos evaluados (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza de la producción de conidios por tratamiento

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F Calc.	F Tab.
Trat	5	0.15	0.03	5.69	2.53 **
Error Exp	30	0.16	0.01		
Total	35	0.31			

Coef. Var.  
(%) 7.75

Debido a que el valor de la F calculada es mayor que la F de tabla, fue necesario realizar una prueba de medias de Tukey, para determinar cuál o cuáles tratamientos eran estadísticamente diferentes respecto al testigo. Los valores de dicho análisis se observan en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Prueba de medias para la producción de conidios por tratamiento

Prueba: Tukey      Alpha: 0.05      756243885.8168  
 Error: 18545666666666688.000      df: 30

Tratamiento	Media	n	S. E.		
2	612333333.33	6	175810820.04	A	
1	551000000.00	6	175810820.04	A	B
3	539666666.67	6	175810820.04	A	B
4	533500000.00	6	175810820.04		B
5	524500000.00	6	175810820.04		B
6	485666666.67	6	175810820.04		B

Tratamientos con letra en común no poseen diferencias significativas

Según los resultados del análisis estadístico, el tratamiento con los mejores resultados fue el número 2 (500 ml), para la variable dosis producidas.

### 7.3 ANÁLISIS ECONÓMICO

Se decidió realizar un análisis económico debido a que las diferencias entre los tratamientos evaluados, que estadísticamente podrían considerarse no significativas, económicamente pudiesen serlo.

Partiendo de la limitante que es la cantidad de erlenmeyer que tiene capacidad cada mesa de agitar durante cada ciclo, que es de 35. Se considera de importancia, determinar cuál de los tratamientos es económicamente más viable para la producción de dosis de *M. anisopliae*. La cantidad de insumos requerida para la producción de un ciclo de agitación en un agitador orbital se calcula en el Cuadro 6, utilizando las cantidades descritas en la sección de materiales y métodos:

Cuadro 6. Insumos requeridos para la preparación de 35 medios líquidos de cultivo

Insumo	Requerimiento por litro	Requerimiento por ciclo de agitación (35 medios)					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
Peptona de caseína (g)	2.5	35.0	43.8	52.5	61.3	70.0	78.8
Extracto de levadura (g)	10.0	140.0	175.0	210.0	245.0	280.0	315.0
Dextrosa anhidro (g)	22.0	308.0	385.0	462.0	539.0	616.0	693.0
Agua desmineralizada (ml)	1000.0	14000.0	17500.0	21000.0	24500.0	28000.0	31500.0
Dispersante Tween 80 (ml)	0.2	2.1	2.6	3.2	3.7	4.2	4.7
Sulfato estéril de estreptomycin (g)	0.5	7.0	8.8	10.5	12.3	14.0	15.8
Tetraciclina (g)	0.5	7.0	8.8	10.5	12.3	14.0	15.8

Considerando la cantidad de insumos requerida por cada ciclo de agitación para cada tratamiento, presentado en la tabla anterior, se procedió a determinar el costo total por cada ciclo de agitación, en lo que respecta a insumos. La información se presenta en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Costo/insumos requeridos para la preparación de un ciclo de agitación

Insumo	Costo/unidad de venta	Monto en quetzales/insumo/ciclo de agitación (35 medios)					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
Peptona de caseína (kg)	Q. 1598.54	Q. 55.95	Q. 70.02	Q. 83.92	Q. 9.79	Q. 111.90	Q. 125.97
Extracto de levadura (kg)	Q. 1818.94	Q. 254.65	Q. 318.31	Q. 381.98	Q. 445.64	Q. 509.30	Q. 572.97
Dextrosa anhidro (kg)	Q. 15.00	Q. 4.62	Q. 5.78	Q. 6.93	Q. 8.09	Q. 4.98	Q. 10.40
Agua desmineralizada (L)	Q. 0.79	Q. 11.06	Q. 13.83	Q. 16.59	Q. 19.36	Q. 22.12	Q. 24.89
Dispersante Tween 80 (l)	Q. 802.37	Q. 1.68	Q. 2.25	Q. 2.57	Q. 2.97	Q. 3.37	Q. 3.77
Sulfato estéril de estreptomycin (kg)	Q. 600.00	Q. 4.20	Q. 5.28	Q. 6.30	Q. 7.38	Q. 8.40	Q. 9.48
Tetraciclina (kg)	Q. 263.01	Q. 1.84	Q. 2.31	Q. 2.76	Q. 3.24	Q. 3.68	Q. 4.16
<b>Total</b>		<b>Q. 334.01</b>	<b>Q. 417.77</b>	<b>Q. 501.05</b>	<b>Q. 584.65</b>	<b>Q. 663.75</b>	<b>Q. 751.62</b>

Luego de obtenido el costo total de insumos para cada tratamiento por ciclo de agitación, se calculó la cantidad de bolsas con sustrato sólido, capaz de inocular por cada tratamiento, bajo el parámetro de 18 ml por bolsa utilizada en la evaluación, lo cual se muestra en el Cuadro 8:

Cuadro 8. Inóculo producido y bolsas inoculadas por tratamiento por ciclo de agitación

Trat.	Volumen/matriz líquida (ml)	Matrices por ciclo	Volumen producido/ciclo	Inóculo requerido/bolsa (ml)	Capacidad inoculación bolsas
T1	400	35	14000	18	778
T2	500	35	17500	18	972
T3	600	35	21000	18	1167
T4	700	35	24500	18	1361
T5	800	35	28000	18	1556
T6	900	35	31500	18	1750

Después de obtener la cantidad de bolsas capaz de inocular por tratamiento por ciclo de agitación, se determinó la cantidad de dosis que podría producir cada tratamiento (Cuadro 8), utilizando los valores obtenidos de conidios / gramo, gramos peso seco y eficiencia en la evaluación. La eficiencia para todos los tratamientos en este caso fue de 100%, debido a que no se perdió material por efectos de contaminación:

Cuadro 9. Dosis producidas por tratamiento por ciclo de agitación

Tratamiento	Potencial inoculación bolsas	Eficiencia producción	Gramos peso seco/bolsa	Conidios por gramo	Dosis producidas
T1 (400 ml)	778	1	218.8	5548188125	188.8
T2 (500 ml)	972	1	208.3	6183612708	250.5
T3 (600 ml)	1167	1	208.3	6146619167	298.8
T4 (700 ml)	1361	1	212.5	6081959583	351.8
T5 (800 ml)	1556	1	202.1	5244375000	329.7
T6 (900 ml)	1750	1	214.6	4991982083	374.9

Con la información de dosis producidas y costo de producción de matrices líquidas en lo que respecta a insumos, se procedió a realizar un análisis de relación beneficio costo, para determinar la cantidad de quetzales que se recuperan por cada quetzal invertido en medios de cultivo líquido, en los diferentes tratamientos. Vale la pena mencionar que el costo de producción se tiene en US dólares, el cual se transformó a quetzales utilizando una tasa de cambio de Q7.9 / US\$:



Cuadro 10. Relación beneficio/costo (RBC) por tratamiento por ciclo de agitación

Tratamiento	Monto invertido matrices líquidas	Dosis producidas	Precio dosis	Monto producido	Relación beneficio costo
T1 (400 ml)	Q 334.00	188.8	Q 94.80	Q 17897.53	53.6
T2 (500 ml)	Q 417.77	250.5	Q 94.80	Q 23746.79	56.8
T3 (600 ml)	Q 501.05	298.8	Q 94.80	Q 28325.67	56.5
T4 (700 ml)	Q 584.65	351.8	Q 94.80	Q 33352.96	57.0
T5 (800 ml)	Q 663.75	329.7	Q 94.80	Q 31257.06	47.1
T6 (900 ml)	Q 751.61	374.9	Q 94.80	Q 35542.29	47.3

Como se observa en el cuadro anterior, el tratamiento del cual se obtuvo una mejor RBC por cada quetzal invertido fue el número cuatro (700 ml), con una relación de Q 57.00 recuperados por cada quetzal invertido. Aunque vale la pena mencionar que todos los tratamientos tuvieron una RBC arriba de 47.3. Por tal razón, se procedió a determinar el costo de oportunidad de cada uno de los tratamientos por ciclo de agitación, considerando que los agitadores tienen una capacidad de 35 erlenmeyer de un .litro de capacidad por ciclo, sin importar el volumen de medio líquido contenido en el interior de estos. Y también considerando como un 100% el valor de dosis producidas por el tratamiento uno, que fue el más bajo de todos.

Posteriormente se procedió a realizar un análisis del costo de oportunidad de cada tratamiento, para poder determinar con cuál de los tratamientos evaluados se obtenía un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada del laboratorio, lo cual se observa en el Cuadro 11:

Cuadro 11. Costo de oportunidad de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Dosis producidas	Costo por dosis	Precio dosis	Rentabilidad por ciclo agitación	Costo de oportunidad
T1 (400 ml)	188.8	Q 38.16	Q 94.80	Q 10693.21	1.00
T2 (500 ml)	250.5	Q 38.16	Q 94.80	Q 14187.96	0.75
T3 (600 ml)	298.8	Q 38.16	Q 94.80	Q 16923.69	0.63
T4 (700 ml)	351.8	Q 38.16	Q 94.80	Q 19927.34	0.54
T5 (800 ml)	329.7	Q 38.16	Q 94.80	Q 18675.10	0.57
T6 (900 ml)	374.9	Q 38.16	Q 94.80	Q 21235.39	0.50

Como se observa, la tendencia del costo de oportunidad es inversamente proporcional al incremento del volumen de medio de cultivo contenido en las matrices líquidas, lo cual quiere decir que a mayor volumen, el costo de oportunidad será menor.

## **IX. CONCLUSIONES**

Para la producción de blastosporas por mililitro se determinó con base en la concentración, que el tratamiento que obtuvo la mayor concentración fue el número dos (500 ml).

Para la producción de conidios por gramo se determinó con base en la concentración, que el tratamiento que obtuvo la mayor concentración fue el número dos (500 ml).

Con respecto al costo de producción, el tratamiento con una mayor rentabilidad fue el número cuatro (700 ml). Mientras que el tratamiento seis (900 ml), a pesar de obtener los valores más bajos en las concentraciones de blastosporas y conidios, fue el que obtuvo los mejores resultados en cuanto al costo de oportunidad y aprovechamiento de la capacidad instalada del laboratorio, esto debido a que al utilizar un volumen mayor en los medios líquidos, permite la inoculación de mayor cantidad de bolsas con sustrato sólido, incrementando el número de dosis producidas por unidad de tiempo.

## X. RECOMENDACIONES

Con base en que lo más importante en el laboratorio del Ingenio La Unión es la producción en masa, se recomienda utilizar el tratamiento seis, para poder producir la mayor cantidad de dosis posible, lo que permitirá tener una mayor disponibilidad de hongo *M. anisopliae* para utilizar en los controles fitosanitarios en el campo.

Se recomienda continuar con esta evaluación, con la finalidad de determinar cuál es el volumen de inóculo por bolsa al que se obtienen los mejores resultados en la concentración de conidios por gramo, pero principalmente en la producción de dosis de *M. anisopliae*.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, E. R.; Hebert, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Costa Rica, ICA. p 289, 728 (serie de cubrís y materiales educativos No. 43)

Agrio Alemán, M.; Ovalle, W. 1998. Producción y manejo del hongo *M. anisopliae* (Match) sor. P 3-6.

Alves, S.B. 1986 (a). Controle microbiano de insectos. Piracicaba, Brasil, Fundação de Estudos Agrarios Luiz de Queiroz / Manole. 424 p.

Alves, S.B. 1986 (b). Fungos entomopatogénicos em controle microbiano de insectos. Editorial Monole, São Paulo, Brasil. p 73-105.

Alves, S. B., Risco, S.H., Silveira Neto, S., Machado Neto, R. 1984. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.) Seitscheift fur Angewandte Entomologie 97:403-406. S, G. N. 1985. Fitopatología. Editorial Limusa. México. p 725-731.

Badilla, F.1998. Metodología para el manejo integrado de cercópidos (*Aenolamia* spp y *Prosapia* spp) (HOMOPTERA: CERCOPIDAE) en el cultivo de la caña de azúcar. Bioasesoría Internacional S.A. (BISA) 31p. (Mimeografiado).

Badilla, F.F. 2000. Utilización del control biológico y alternativas no químicas para el manejo de plagas insectiles en el cultivo de la caña de azúcar en Costa Rica. International Sugar Journal. Vol. 102, N°1221. p. 482-490.

Badilla, F.; Arias, M. 2000. Evaluación de trampas amarillas para el control de *Aeneolamia varia*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) N° 58 p 61-65.

Badilla, F., Toledo, J.C.; Barreno, C. 1996. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en adultos de la “chinche salivosa” *Aeneolamia alfofasciata* y *Prosapia* spp. (HOMOPTERA:

CERCOPIDAE) en caña de azúcar en Escuintla, Guatemala. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No.42 p.39-44.

Bernal, M. G.; Bustillo, A. E.; Posada, F. J. 1994. Virulencia de aislamientos de *Metarhizium* spp. y su eficiencia en campo sobre *Hypothenemus hampei*. Revista Colombiana de Entomología 20(4):225-228.

Calderón, N. M. 1982. Cercópidos, plagas de los pastos en América tropical, biología y control. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 47p.

Camo, T. 1999. Evaluación de Cuatro Aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Para el control Microbiano de Chinche Salivosa (*Aeneolamia* sp) Bajo Condiciones Controladas. 1, 5, 6, 7 p.

Carrillo, E. 1994. Informe de actividades del área de Entomología diciembre 1993. Guatemala, Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la caña de Azúcar. 7 p.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1982. Cercópidos de los pastos en América Tropical. Biología y control: guía de estudio. Cali, Colombia. CIAT. 51p.

Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA). El Salivazo de la Caña de Azúcar (*Aenelomaia varia*). Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en:

[http://www.cenicana.org/investigacion/variedades/sanidad\\_vegetal.php?opcion=2&opcion2=13](http://www.cenicana.org/investigacion/variedades/sanidad_vegetal.php?opcion=2&opcion2=13)

Comité de Manejo Integrado de Plagas Cañamip - Guatemala. 2012. Análisis e la zafra 2011 – 2012. 18 p.

Devoto, L; Geraldin, M; France, A. 2003. Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtención de biopesticidas. Chile, Ministerio de Agricultura. 4 p.

Esquivel, E. 1984. Algunas plagas de la caña de azúcar. México, Gepacea. 15 p.

Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC). Control biológico de la chinche salivosa en el cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. Consultado el 16 de agosto de 2013. Disponible en URL:

[http://fausac.usac.edu.gt/GPublica/index.php/Control\\_biol%C3%B3gico\\_de\\_chinche\\_salivosa\\_en\\_Ca%C3%B1a\\_de\\_Az%C3%BAcar\\_en\\_Guatemala#Clasificaci.C3.B3n\\_taxon.C3.B3mica\\_y\\_distribuci.C3.B3n\\_geogr.C3.A1fica](http://fausac.usac.edu.gt/GPublica/index.php/Control_biol%C3%B3gico_de_chinche_salivosa_en_Ca%C3%B1a_de_Az%C3%BAcar_en_Guatemala#Clasificaci.C3.B3n_taxon.C3.B3mica_y_distribuci.C3.B3n_geogr.C3.A1fica)

Finch, H. C.; Finch, A. N. 1974. Los hongos comunes que atacan cultivos en América latina. Editorial Trillas, México. P 157.

Flores Cáceres, S. 2007. Las plagas de la caña de azúcar en México, Segunda edición. Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica. 277p.

García, M. 2002. Evaluación del parasitismo de diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas de chinche salivosa (*Aeneolamia* sp.) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en Siquinalá, Escuintla. 9 p.

Leucona, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. 35-204 p.

National Academy of Sciences, US. 1987. Control de plantas y animales; plantas nocivas y cómo combatirlas. México, Limusa. v. 2, 574 p.

Peck, D. (2001) Memorias, Taller sobre la bioecología y manejo de cercópodos en gramíneas. CENGICANA, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla.

Rodríguez, D. 1993. Hongos entomopatógenos. *In* Control biológico en Colombia: historia, avances y proyecciones. Colombia, Universidad Nacional de Colombia-Palmira. p. 30-42.

Rodríguez, S. R; Rodríguez, J. C; Riestra, D; Villanueva, J. A.; Rodríguez, D. A. 2002. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas 64:34-40.

Salazar, S. A. 1990. Manejo integrado de insectos-plaga de la caña de azúcar en la región occidental de Venezuela. Barquisimeto, Venezuela, Estación experimental Lara. P 325-334.

Salguero, Z. P. 2008. Cambios en el proceso de producción del hongo *Metarhizium anisopliae*, (Myceatae, Moniliales) y su efecto en el rendimiento final en el laboratorio del Ingenio Pantaleón, Siquinalá. Escuintla. p 3.

Soto Alcalá, J. 2008. Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su toxicidad sobre el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). p 17.

Toledo, J. C.; Badilla, F. 1996. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* en adultos de *Aeneolamia albofasciata* y *Prosapia* spp. en el ingenio La Unión, Guatemala. Guatemala, ATAGUA. p. 5-13.

Triplehorn, C., Johnson, N. 2011. Estudio dos insetos, Tradução da 7ª edição de Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects, p 418.

Villacorta, A. s.f. Búsqueda de un método para combatir las cigarritas. Brasil, Instituto agronómico de Paraná. 3 p.

## XII. ANEXOS

Cuadro 12. Detalle de los insumos utilizados en la producción de *M. anisopliae* y su costo

Insumo	Presentación de compra (PC)	Costo PC	Requerimiento insumo/mes	Costo insumo/mes	Participación costo %	Acum.
Maíz amarillo quebrantado	Quintal	Q250.00	183.50	Q45,875.00	60.26	60.26
Extracto de levadura	Kilogramo	Q1,818.94	7.00	Q12,732.58	16.72	76.98
Bolsas de polipropileno	Unidad	Q0.28	29400.00	Q8,232.00	10.81	87.79
Agua desmineralizada	Litro	Q0.79	4371.40	Q3,453.41	4.54	92.33
Peptona de caseína	Kilogramo	Q1,598.54	1.75	Q2,797.45	3.67	96.00
Agar agar	Kilogramo	Q2,040.00	0.53	Q1,071.00	1.41	97.41
Estreptomicina	Kilogramo	Q600.00	0.80	Q480.00	0.63	98.04
PDA	Kilogramo	Q1,112.76	0.37	Q410.11	0.54	98.58
Dextrosa anhidro	Kilogramo	Q15.00	20.30	Q304.50	0.40	98.98
Haba	Kilogramo	Q55.00	3.68	Q202.13	0.27	99.25
Agar plate count	Kilogramo	Q749.17	0.21	Q159.29	0.21	99.45
Cinta indicadora autoclavado	Rollo	Q55.00	2.50	Q137.50	0.18	99.64
Alcohol líquido	Galón	Q42.50	3.00	Q127.50	0.17	99.80
Tetraciclina	Kilogramo	Q263.01	0.44	Q115.07	0.15	99.95
Tween 80	Litro	Q802.37	0.04	Q35.10	0.05	100.00
<b>Costo Total</b>				<b>Q76,132.63</b>	<b>100.00</b>	

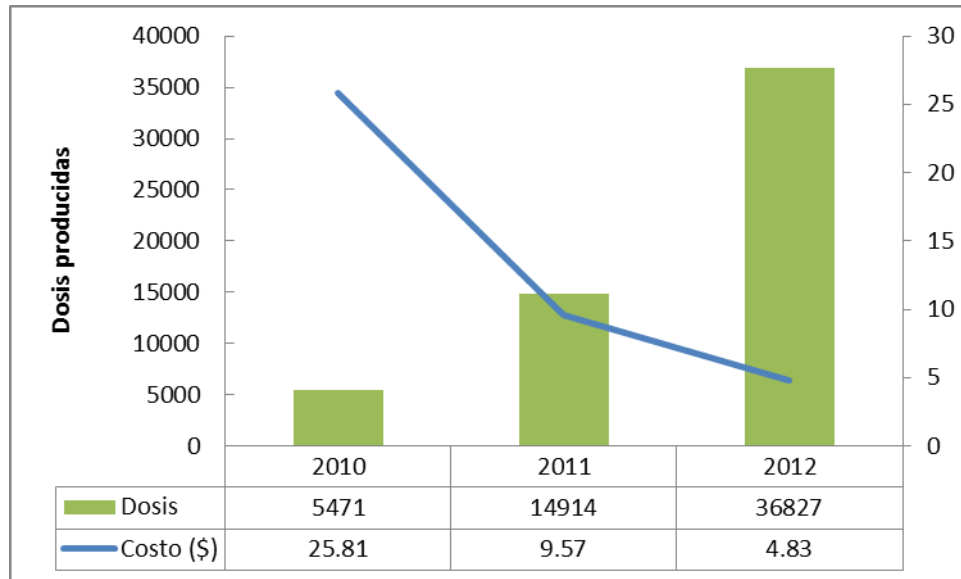


Figura 10. Producción de *M. anisopliae* versus costo por dosis Ingenio La Unión S. A.



## 12.1 Glosario

- **Conidio (conidiospora):** son las esporas asexuales externas. Si están implantadas directamente sobre la hifa se llaman sésiles. La parte del micelio que origina y sostiene a las esporas se denomina esporóforo y si se trata de conidios se dice conidióforo.
- **Blastosporo (blastoconidio):** son las esporas que se originan de una parte de una célula somática, una hifa, un conidióforo u otra espora y se desarrollan antes de la formación del septo que lo separa de la célula de origen.
- **Erlenmeyer:** son recipientes generalmente de vidrio, de forma troncocónica, que se utiliza en laboratorio para medir o contener líquidos.
- **Cámara de Neubauer:** es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de células en un medio líquido.