

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



“Respuesta a la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, en Ingenio Magdalena S.A.”

Trabajo de investigación presentado por Lester Iván Torres Reyes
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en
Tecnología Agrícola y Pecuaria

Guatemala
2015

“Respuesta a la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, en Ingenio Magdalena S.A.”

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería

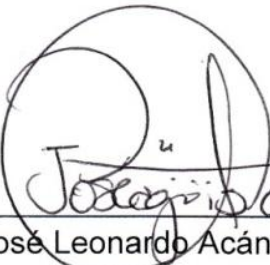


“Respuesta a la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, en Ingenio Magdalena S.A.”

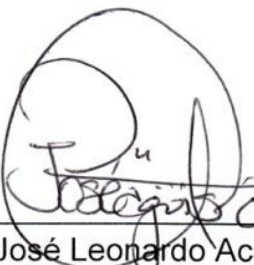
Trabajo de investigación presentado por Lester Iván Torres Reyes para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Tecnología Agrícola y Pecuaria

Guatemala
2015

Vo.Bo.:

(f) 
Ing. José Leonardo Acán Aguilar

Tribunal Examinador:

(f) 
Ing. Agr. José Leonardo Acán Aguilar

(f) 
Ing. Agr. Jorge Luis Gómez

(f) 
Ing. Agr. Luis Valerio Macz López

Fecha de aprobación: Guatemala, 17 de agosto de 2015.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios, por su gracia, bendición y misericordia infinita a lo largo de mi vida.

Ingenio Magdalena S.A., por brindarme su apoyo en esta investigación y permitir mi desarrollo como profesional.

Ing. José Acán, por su apoyo, conocimientos y amistad brindada durante la asesoría de esta investigación.

División de Investigación y Desarrollo del Ingenio Magdalena S.A. en especial a los Ingenieros Edgar Solares, Estuardo López, Luis Guevara y personal de laboratorio de producción de entomopatógenos por su valioso apoyo en la realización del experimento.

Universidad del Valle de Guatemala Campus Sur, por ser forjadora de mi profesión.

A todas las personas de las que recibí de alguna u otra forma el apoyo necesario tanto en la investigación como en mi etapa de estudiante en especial a: Tec. Adán Reyes, Ingra. Julia Blanco, Lic. Osbel Núñez, Ing. Gabriel Álvarez, Ingra. Astrid Galindo, Leonela Menjívar

DEDICATORIA

A:

Dios, por el apoyo espiritual y brindarme la bendición de culminar esta meta y de mostrarme los mejores caminos a lo largo de estos 21 años de vida.

Mis padres y hermanos, por el apoyo incondicional recibido, simplemente gracias, nada hubiese sido posible sin ustedes.

Universidad del Valle de Guatemala Campus Sur, mi alma mater.

Mis amigos, en especial a Fiorela Fernández, Fernanda Castillo, Astrid Morales, Marko (QEPD), Antonio (QEPD), Isa Bonn, Rocio Ramírez, Carla Morales, Liza Valle y todos los Platypus. Va por ustedes.

Los compañeros de estudio, Silvia Dávila, Nathaly Ortiz, Esvin López, Enrique Meoño, Frederick Mancio, Ángel Ordóñez y Hugo Hernández por los momentos vividos desde el bachillerato.

Mi país Guatemala, haré lo que pueda por verte feliz.

CONTENIDO

| | Página |
|---------------------------------|---------------|
| LISTA DE CUADROS..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| RESUMEN..... | xii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. JUSTIFICACIÓN..... | 3 |
| III. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| IV. OBJETIVOS..... | 18 |
| V. METODOLOGÍA..... | 19 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 27 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 35 |
| VIII. RECOMENDACIONES..... | 36 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |
| X. ANEXOS..... | 40 |

LISTA DE CUADROS

Página

| | |
|--|----|
| 1. Promedio de variables climáticas de los años 2009-2013 de la Finca San Patricio..... | 19 |
| 2. Descripción de los tratamientos a evaluar para la suplementación con Nitrógeno en diferentes etapas del proceso de producción del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> | 20 |
| 3. Análisis de varianza bifactorial realizado a los tratamientos evaluados..... | 27 |
| 4. Comparación estadística entre los tratamientos evaluados para la variable concentración de conidios/gr..... | 28 |
| 5. Comparación estadística de la suplementación con N en las distintas etapas del proceso de producción de <i>M. anisopliae</i> para la variable concentración de conidios/gr..... | 29 |
| 6. Comparación estadística de las dos cepas de <i>M. anisopliae</i> evaluadas para la variable concentración de conidios/gr..... | 30 |
| 7. Análisis de varianza bifactorial realizado a los tratamientos evaluados para la variable Viabilidad de conidios..... | 31 |
| 8. Comparación estadística entre los tratamientos evaluados para la variable viabilidad de conidios..... | 32 |
| 9. Comparación estadística de la suplementación con Nitrógeno las distintas etapas del proceso de producción de <i>M. anisopliae</i> para la variable viabilidad de conidios..... | 33 |
| 10. Comparación estadística de las dos cepas de <i>M. anisopliae</i> evaluadas para la variable viabilidad..... | 34 |
| 11. Cálculos de la cantidad de Urea por cada 350 gramos de arroz para suplementar..... | 41 |
| 12. Cronograma de actividades durante la investigación..... | 41 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Morfología del hongo <i>M. anisopliae</i> | 5 |
| 2. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno..... | 6 |
| 3. Detalle de adultos de <i>Aeneolamia</i> spp. parasitados con el hongo <i>M. anisopliae</i> utilizados para revigorización..... | 9 |
| 4. Aislamiento del hongo <i>M. anisopliae</i> crecido sobre medio agar-haba..... | 10 |
| 5. Matrices líquidas de <i>M. anisopliae</i> después de 48 horas de agitación..... | 10 |
| 6. Bolsas con sustrato después de inoculadas con <i>M. anisopliae</i> | 11 |
| 7. Bolsas con <i>M. anisopliae</i> esporulado luego de la fase de desarrollo..... | 11 |
| 8. Detalle de <i>M. anisopliae</i> después de la fase de secado..... | 12 |
| 9. Dosis de <i>M. anisopliae</i> almacenadas en cuarto frío..... | 13 |
| 10. Diagrama de la cámara de Neubauer para realizar conteo de conidios..... | 25 |
| 11. Efecto de la suplementación con Nitrógeno en las distintas etapas del proceso de producción de las dos cepas de <i>M. anisopliae</i> sobre la producción de conidios/gr..... | 28 |
| 12. Efecto del factor suplementación con Nitrógeno sobre la concentración de conidios/gr del hongo <i>M. anisopliae</i> | 30 |
| 13. Efecto del factor cepa sobre la concentración de conidios/gr del hongo <i>M. anisopliae</i> | 31 |

| | |
|---|----|
| 14. Efecto de la suplementación con Nitrógeno en las distintas etapas del proceso de producción de las dos cepas de <i>M. anisopliae</i> sobre la viabilidad de conidios..... | 32 |
| 15. Efecto del factor suplementación con Nitrógeno sobre la viabilidad de conidios del hongo <i>M. anisopliae</i> | 33 |
| 16. Efecto del factor cepa sobre la viabilidad de conidios del hongo <i>M. anisopliae</i> | 34 |
| 17. Análisis bromatológico realizado a los granos de arroz utilizado para la producción de <i>M. anisopliae</i> | 40 |

RESUMEN

El experimento se llevó a cabo dentro de las instalaciones del laboratorio de producción de entomopatógenos del Ingenio Magdalena S.A. ubicado en el interior de Finca San Patricio, La Democracia, Escuintla con la finalidad de evaluar la respuesta a la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas de producción de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para las variables concentración de conidios/gr y viabilidad de los conidios utilizando granos de arroz entero como sustrato.

Se evaluaron 8 tratamientos bajo un arreglo combinatorio bifactorial en un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Los factores evaluados consistieron en la suplementación con Nitrógeno, la cual se realizó en la etapa de elaboración de matriz, la etapa de inoculación y la etapa de desarrollo. además de el testigo relativo que consistió en la metodología convencional del laboratorio. Mientras que las cepas evaluadas fueron la PL-43 y BISA-01 2000. La fuente de Nitrógeno utilizada para la suplementación fue Urea (46% N).

Los resultados mostraron que no existió una respuesta incremental en la concentración de conidios/gr de los tratamientos suplementados con Nitrógeno ya que el testigo sin este elemento de ambas cepas mostró una concentración de conidios/gr estadísticamente superior ($p < 0.05$) a los tratamientos suplementados. La cepa PL-43 mostró una mayor concentración de conidios/gr que la cepa BISA-01 2000. En cuanto a la variable viabilidad de conidios, se encontró que la suplementación en la etapa de desarrollo fue estadísticamente ($p < 0.05$) inferior al resto de tratamientos.

Se recomienda evaluar otras fuentes de Nitrógeno y diferentes concentraciones del mismo como suplemento y para corroborar el efecto fungistático de la amonificación proveniente de la urea. Así como también evaluar la suplementación con Nitrógeno a otros sustratos distintos a los granos de arroz.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Guatemala representa una de las actividades económicas más importantes del país. Guatemala es uno de los productores de azúcar más importantes a nivel mundial, posicionándose como el cuarto exportador y el tercer productor por Hectárea. El área sembrada con caña de azúcar al 2013 fue de 230 mil Hectáreas. La agroindustria azucarera guatemalteca, que representa alrededor del 3% del PIB nacional, genera 421,000 empleos directos e indirectos, 32,000 corresponden a cortadores de caña y representa un 27 % de las exportaciones agrícolas (AZASGUA, 2014).

No obstante, pese a ser un cultivo altamente productivo, la caña de azúcar se ve atacada por un buen número de especies plaga, que incluye básicamente roedores e insectos, dentro de los cuales se encuentra la chinche salivosa (*Aeneolamia* spp.), la cual es considerada como la plaga más importante del cultivo debido a las reducciones de producción de caña y azúcar que ocasiona con su ataque (Márquez, J.M., 2012).

El manejo integrado de la chinche salivosa se ha basado en prácticas que incluyen labores culturales para el control de los huevecillos del suelo (Márquez, J.M., 2012) y control biológico, en el cual se emplea el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, el cual es uno de los enemigos naturales de esta especie (Leucona, R.E., 1996).

Por su parte, algunos de los diferentes ingenios que conforman la agro industria azucarera han invertido en la implementación de laboratorios de producción de hongos entomopatógenos, principalmente para *Metarhizium anisopliae*, tal es el caso del Ingenio Magdalena que anualmente produce 80 mil dosis de 5^{12} conidios de este organismo.

Sin embargo, a pesar de que la producción de *Metarhizium anisopliae* se ha tecnificado para abaratar los costos de producción y por ende los de control biológico de la chinche salivosa, aún existen aspectos a mejorar, entre los cuales está incrementar la producción de conidios del hongo, las cuales son las que se toman como base para formular las respectivas dosis utilizadas para su aplicación en los campos de cultivo.

Un factor importante en el proceso de producción del entomopatógeno es la escogencia del sustrato sobre el cual se desarrollará el hongo, ya que constituye la fuente de nutrientes que le sirven al hongo para germinar y luego esporular (Li, D. & Holdon, D., 1995).

Actualmente en el laboratorio de producción de entomopatógenos de Ingenio Magdalena S.A. se utilizan granos de arroz como sustrato principal para la producción de *Metarhizium anisopliae*, sin embargo no se han obtenido producciones de conidios aceptables, probablemente debido a que el sustrato no le provee al hongo los nutrientes suficientes para esporular en cantidades altamente productivas.

En la presente investigación se realizó una evaluación de la respuesta a la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción de las dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* que se produce en el laboratorio de Ingenio Magdalena S.A., las cuales corresponden a la cepa BISA-01 2000 y a PL-43, las cuales han mostrado ser eficientes para el control de chinche salivosa.

Se estableció un experimento factorial de 2x4, en la cual el factor A fue la cepa del hongo *Metarhizium anisopliae* y el factor B fue la suplementación con Nitrógeno. Para ello se utilizó Urea como fuente de Nitrógeno. La investigación consistió en 8 tratamientos con 4 repeticiones para un total de 32 unidades experimentales, las cuales consistieron en una bandeja plástica que a su vez estuvieron compuestas de 16 bolsas de 350 gr de arroz inoculadas de acuerdo con el respectivo tratamiento.

Para la inoculación del hongo se utilizó la técnica de las matrices líquidas, las cuales se prepararon con un aislamiento de las cepas utilizadas. Se llevaron a cabo movimientos de ruptura de micelio a los días 4, 8 y 12 post inoculación, para luego proceder al secado de los tratamientos y el respectivo conteo de conidios por gramo y viabilidad de las mismas. A los resultados se les practicó un Análisis de Varianza y la prueba de medias con el estadístico de Tukey al 5 % de significancia.

II. JUSTIFICACIÓN

El hongo *Metarhizium anisopliae* es el entomopatógeno más investigado y más difundido en la zona cañera de Guatemala, en la cual es incluido en planes de Manejo Integrado de Plagas, sobre todo de la chinche salivosa *Aeneolamia* spp. (HEMIPTERA: Cercopidae), la cual es la plaga de mayor importancia para el cultivo de caña de azúcar en Guatemala y este hongo figura como uno de los enemigos naturales de esta especie (Márquez, J.M., 2012).

La producción de *M. anisopliae* se ha masificado en los diferentes ingenios de la agroindustria azucarera, ya que son 4 empresas que cuentan con laboratorios especializados en la producción masiva de este organismo. Uno de estos es el Ingenio Magdalena S.A. que anualmente produce 80 mil dosis de 5^{12} conidios para el control biológico de diferentes plagas, principalmente *Aeneolamia* spp.

Los parámetros productivos del laboratorio de entomopatógenos del Ingenio Magdalena S.A. son principalmente la concentración de conidios/gr del hongo *Metarhizium anisopliae*, el porcentaje de viabilidad del mismo y la cantidad total de dosis producidas.

Actualmente, dentro de las metas del laboratorio de entomopatógenos es que la concentración de conidios por gramo de sustrato sea mayor de 4.5^9 , sin embargo esto aún no se ha logrado establecer del todo teniendo valores máximos entre 1.5 y 3.5^9 conidios/gr, lo cual significa un aumento en los costos de producción para una dosis de *Metarhizium anisopliae*, sobre todo en la cantidad de sustrato.

La producción de conidios de los entomopatógenos, entre los que se incluye *Metarhizium* depende de gran manera tanto de las condiciones ambientales sobre las que se produzca y de la composición química del sustrato sobre el cual se inocule. En el caso de los granos de arroz, aún no se han obtenido una producción conidial deseada, lo cual puede deberse a una alta relación de Carbono: Nitrógeno, ya que este material es alto en carbohidratos pero bajo en proteínas.

En el presente estudio, se pretende corroborar si la suplementación con Nitrógeno en diferentes etapas tiene un efecto incremental sobre los parámetros de producción de conidios/gr y el porcentaje de viabilidad de los mismos, en las dos cepas del hongo *M. anisopliae* que se producen en el laboratorio de entomopatógenos del Ingenio Magdalena S.A

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades del hongo *Metarhizium anisopliae*

3.1.1. Clasificación taxonómica del hongo *Metarhizium anisopliae*. De acuerdo con Tanada y Kaya (1993), taxonómicamente el hongo *Metarhizium anisopliae* está clasificado de la siguiente manera:

Reino: *Fungi*

Subreino: *Dikarya*

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Clavicipitaceae*

Género: *Metarhizium*

Especie: *Metarhizium anisopliae*

3.1.2. Caracterización morfológica de *Metarhizium anisopliae*. Según Cañedo y Ames, (2004) la morfología de *M. anisopliae* es la siguiente:

3.1.2.1. Colonia. Pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento. Revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino.

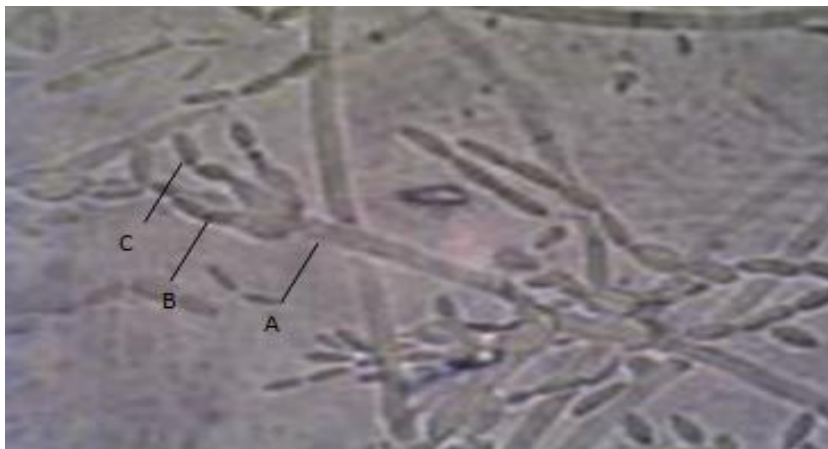
3.1.2.2. Conidióforo. Es la estructura que alberga las conidios. Nace del micelio y es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada septa. De 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro.

3.1.2.3. Fiálides. Cilíndricos en forma de clava, adelgazados en el ápice. Miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro.

3.1.2.4. Conidios. Unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μ de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro.

En la Figura 1 se muestra a detalle la morfología del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Figura 1. Morfología del hongo *Metarhizium anisopliae*. A. Conidióforo. B. Fiálide. C. Conidio.



Fuente: Cañedo, V. & Ames, T. 2004.

3.1.3. Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*. En general, los hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* luego de parasitar un insecto, desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción (Cañedo, V. & Ames, T. 2004).

El proceso se inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación (Pedrini *et al.*, 2007).

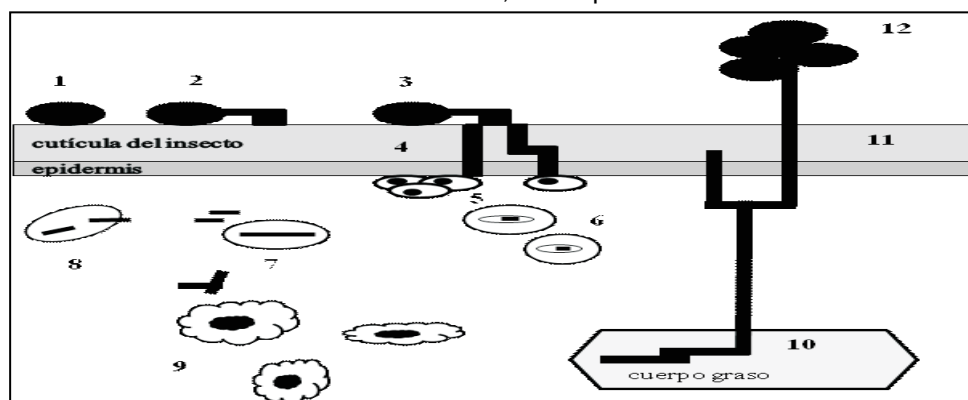
En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Monzón, 2001).

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales realizan la digestión del integumento (Tanada y Kaya, 1993). Se ha observado que la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico (Bidochka y Kachatourians, 1991). En esta fase se produce una descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo.

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación. Esta micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Bustillo, 2001).

En la Figura 2, se esquematiza todo el ciclo de vida de un hongo entomopatógeno como *Metarhizium anisopliae* al atacar a un insecto.

Figura 2. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno. 1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del apresorio, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el hemocele, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Esporulación.



Fuente: Téllez-Jurado, A. 2009.

3.1.4. Requerimientos ambientales del hongo *Metarhizium anisopliae*

3.1.4.1. Temperatura. La temperatura es un factor limitante para el desarrollo en las diferentes fases del ciclo de vida de *M. anisopliae*. La temperatura varía según la fase en la que se encuentre *M. anisopliae*, por ejemplo Berlanga, A. & Velásquez, V. (2002) determinaron que los aislamientos de *M. anisopliae* crecen de manera óptima a temperaturas de entre 24 y 30 °C, mientras que a 20 y arriba de 30 °C el crecimiento del micelio disminuye.

El desarrollo de las enfermedades fúngicas en los insectos puede ser perjudicado por temperaturas superiores a 30 °C. Las esporas de hongos entomopatógenos germinan a temperaturas entre 15 y 35 °C, siendo el rango óptimo entre 25 y 30°C, y se requieren cuatro días para la esporulación de *Metarhizium anisopliae*. La esporulación es inhibida a temperaturas inferiores de 10 °C y superiores a 35 °C (Castillo, 2006).

3.1.4.2. Actividad de agua. La humedad disponible para las funciones fisiológicas constituye el factor más importante para el desarrollo de todos los hongos filamentosos. La humedad estimula el desarrollo y formación de estructuras reproductoras de las especies del reino Fungi. La actividad acuosa para los hongos entomopatógenos en este caso debe ser superior a 96%. Aunque pueden tolerar un mínimo de 70% (Ramana, et al. 1993 citado por Peña, V. 2002).

3.1.4.3. Humedad Relativa. La humedad relativa es un factor de gran importancia, tanto para el hospedante como para el patógeno. Es indispensable en las diferentes fases del ciclo de las relaciones entre ambos organismos. Tiene efecto sobre la germinación, penetración y para la reproducción de los hongos entomopatógenos. La falta de humedad relativa adecuada puede perjudicar una epizootia (Lecuona, 1996).

Se requiere de humedad relativa alta para la germinación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. El estudio de Walstad y Cols. 1970, indica que la mayor germinación ocurre al 100% de humedad relativa y disminuye a 0 %, a una HR de 85%. Niveles altos de HR son necesarios para la esporulación. A un nivel de HR del 100% la esporulación ocurre en cuatro días, pero a una HR de 92.5% son necesarios cinco o más días, mientras que la esporulación es inhibida con humedad relativa menor del 90% (Sosa-Gómez y Alves 1983).

3.1.4.4. Radiación. En el caso del hongo *M. anisopliae* se ha observado que en fases de desarrollo miceliar en procesos de producción masiva, responde bien a fotoperíodos de 12:12 horas Luz-Oscuridad. Ya que con esto se estimula la producción de conidios (IMSA, 2010).

Sin embargo, para evaluar el efecto de la radiación solar sobre los patógenos y sobre la ocurrencia de la parasitación en insectos es necesario considerar los siguientes aspectos: espectro de luz visible con sus diferentes longitudes de onda (luz verde, amarilla, azul, etc.), fotoperíodo y faja de luz ultravioleta germicida. La exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidios de los patógenos se observó que el crecimiento y esporulación de los hongos es retrasado por la radiación solar y que la nubosidad tiene un papel importante en el desarrollo de las epizootias causadas por hongos entomopatógenos (Castillo, 2006).

3.1.5. Requerimientos nutricionales para la esporulación de *M. anisopliae*. En general, los requerimientos tanto físicos como químicos para la fase de producción de conidios o esporas en los hongos entomopatógenos son más estrictas que la fase de desarrollo miceliar. Estos cambios se reflejan a nivel molecular y responden a las síntesis de proteínas, cambios en el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos nucleicos ARN y ADN (Moore, 1996).

3.1.5.1. Carbono. En general, los entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* utilizan los carbohidratos para la producción de conidios. En este proceso se necesitan tanto monosacáridos como la fructuosa y la glucosa, así como polisacáridos como la trehalosa, el glicógeno (polisacárido de reserva producido en el citoplasma) y el glucano (producido en la pared celular). (Moore, 1996).

3.1.5.2. Nitrógeno. Los hongos entomopatógenos requieren de fuentes de Nitrógeno en forma nítrica o de aminoácidos para esporular, esto es diferente a la fase de desarrollo miceliar, en la cual requieren de nitrógeno amoniacal para su crecimiento. Esto se debe a que el nitrógeno amoniacal alcaliniza el medio en el que crece, lo cual es perjudicial para la producción de esporas.

Los nitratos, la Urea y los aminoácidos son las mejores fuentes de Nitrógeno para inducir la esporulación de entomopatógenos (Moore, 1996).

3.1.6. Proceso de producción masiva de *Metarhizium anisopliae*. De acuerdo con IMSA (2010) el proceso de producción de *M. anisopliae* consta de las siguientes etapas:

3.1.6.1. Revigorización. La fase de revigorización consiste en el reforzamiento de las características entomopatogénicas del hongo. Para ello se colectan adultos y ninfas de chinche salivosa *Aeneolamia* spp. En campos de cultivo de caña de azúcar. Se llevan a cámaras húmedas y son asperjadas con una solución de agua más esporas de *M. anisopliae*. Este procedimiento es repetitivo y se realiza 3 veces, obteniendo las esporas de la primera revigorización para la segunda y sucesivamente (Ver Figura 3).

Figura 3. Detalle de adultos de *Aeneolamia* spp. parasitados usados para revigorización. Izquierda, esporulación de *M. anisopliae* sobre el insecto. Derecha, Insecto aún no esporulado.

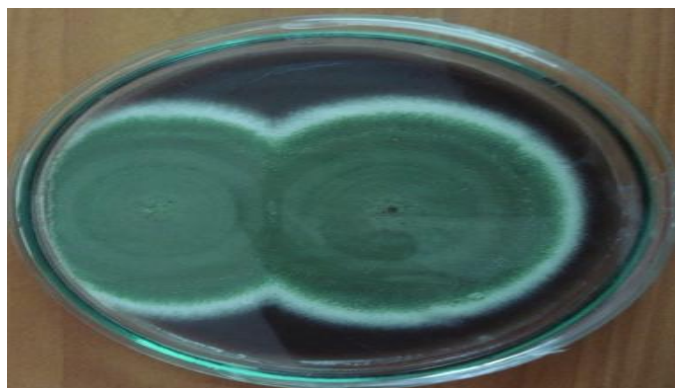


Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.6.2. Aislamiento e incremento del hongo. Consiste en obtener una cantidad adecuada de inóculo que permita mantener una producción constante de conidios. Para ello se emplea un medio de cultivo a base de Haba más agar y un antibiótico previamente esterilizados. Este medio de cultivo se sirve en placas Petri de vidrio y posteriormente son inoculadas con esporas de *M. anisopliae* obtenidas de los insectos de la fase de revigorización (ver Figura 4).

Las actividades que se desarrollan en esta fase se deben realizar bajo condiciones totalmente asépticas. Para lo anterior toda la cristalería e instrumentalización requerida, así como el agua utilizada deberá ser estéril.

Figura 4. Aislamiento del hongo *M. anisopliae* creciendo sobre medio agar-haba.



Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.6.3. Preparación de matrices. Las matrices constituyen el medio sobre el cual el hongo *M. anisopliae* se prepara para inocular las bolsas que constituirán las dosis finales. Para realizar una matriz se utiliza en 500 ml de agua más levadura de cerveza y azúcar como fuentes de carbohidratos, peptona de caseína, saboroud y antibióticos como tetraciclina y cloranfenicol. A esta solución se le agrega un aislamiento crecido en medio de agar-haba. Estas matrices se agitan en máquinas durante 48 horas antes de inocular las bolsas con sustrato (ver Figura 5).

Figura 5. Matrices líquidas de *M. anisopliae* después de 48 horas de agitación



Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.6.4. Preparación y esterilización del sustrato. El sustrato, el medio sobre el cual se desarrollará el hongo. Comúnmente, se utilizan granos de cereales como arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Estos se someten a un proceso de cocción en agua a 80 °C para darle una consistencia gelatinosa. Posteriormente el grano ya cocido se introduce en bolsas de polietileno las cuales se esterilizan en autoclave a una temperatura de 125 °C y 15 PSI de presión, este proceso es clave para evitar la contaminación con otros microorganismos que compiten con *M. anisopliae* para colonizar el sustrato.

3.1.6.5. Inoculación. La fase de inoculación consiste en la siembra del hongo de las matrices agitadas sobre el sustrato previamente esterilizado. Se utilizan 16 cc de la solución de la matriz líquida para inocular cada bolsa de polietileno con sustrato (ver Figura 6).

Figura 6. Bolsas con sustrato después de inoculadas con *M. anisopliae*.



Fuente: Reyes, A. IMSA

3.1.6.6. Desarrollo. La fase de desarrollo comprende desde el momento en que el hongo ha sido inoculado hasta la producción de esporas. En esta fase el micelio comienza a invadir el sustrato y la tonalidad va tornándose verde conforme pasan los días. Para ello se necesita una temperatura de 24 °C y una humedad relativa de 70 %, así como foto período de 12:12 Luz-Oscuridad. Para ello las bolsas se trasladan en estantes a salas especiales y se les hace movimiento cada 4 días para oxigenar el micelio y liberar los conidios que se vayan produciendo. En total esta fase dura 12 días (ver Figura 7).

Figura 7. Bolsas con *M. anisopliae* esporulado luego de la fase de desarrollo.



Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.6.7. Secado. La fase de secado consiste en retirar el exceso de humedad del hongo ya esporulado para lograr la solidificación de los granos de sustratos. Para ello el hongo se coloca en bandejas de plástico y se deja secar a una temperatura de 24 °C durante 8 días bajo condiciones de iluminación constante (Ver Figura 8).

Figura 8. Detalle de *M. anisopliae* después de la fase de secado.



Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.6.8. Conteo de concentración de conidios. En esta fase del proceso se determina cuánto ha esporulado el hongo luego de secado. Para ello se toman muestras de 10 g y se diluyen en agua desmineralizada más dispersante Tween 80 (aceite hidrogenado poliglicolisado). Para ello se utiliza una cámara de Neubauer o hematocitrómetro. El resultado final se expresa en cantidad de conidios/gr.

3.1.6.9. Conteo de viabilidad de conidios. Este conteo se realiza para determinar el porcentaje de conidios que tienen la capacidad de germinar y desarrollarse. Este dato es importante para la formulación de las dosis. Se buscan porcentajes de viabilidad que estén arriba de 90 %.

3.1.6.10. Formulación y almacenamiento. La formulación del hongo consiste en la preparación de las dosis que se aplicarán en los cañaverales. Una dosis consiste en una cantidad de 5^{12} conidios. Para ello, normalmente se requieren 4 kg de sustrato ya esporulado por el hongo *M. anisopliae*. Para formular una dosis se toman en cuenta los datos de viabilidad y concentración de conidios/gr. posteriormente son almacenadas en cuartos fríos a una temperatura de 4 °C para evitar que se pierda la viabilidad de las conidios (ver Figura 9).

Figura 9. Dosis de *M. anisopliae* almacenadas en cuarto frío.



Fuente: Reyes, A. IMSA.

3.1.7. Microorganismos contaminantes

3.1.7.1. *Fusarium*. Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran. Estas coloraciones pueden ser naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen macro y micro conidios (Monzón, V. 2001).

3.1.7.2. *Penicillium*. Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en filies o célula fértiles productoras de conidios, las cuales son producidas basipetalamente y unidas en cadenas. Las conidios son globosas a elípticos, lisos o equinulados. (Monzón, V. 2001).

3.1.7.3. *Aspergillus flavus*. Es un hongo cancerígeno, tiene conidióforos hialinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula. Conidios globosos a ovals (Monzón, V. 2001).

3.1.8. Importancia de *M. anisopliae* para el cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es uno de los de mayor importancia para la economía de Guatemala. La agroindustria azucarera está posicionada en la economía guatemalteca como uno de los pilares fundamentales de esta, ya que representa la segunda actividad

económica que más divisas genera en el país. El azúcar y las mieles componen el 27 % de las exportaciones del sector agrícola y el 12 % de las exportaciones en total. (AZASGUA, 2014.).

No obstante, el cultivo de la caña de azúcar se ve amenazado por varias especies que son plagas, ya que causan pérdidas económicas a los ingenios azucareros. El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) a través del Comité CAÑAMIP, ha clasificado la importancia de las diversas plagas que ocurren en la zona cañera de Guatemala, en base al impacto que pueden causar en la producción, lo cual se traduce en pérdidas económicas significativas. En el caso de la chinche salivosa (*Aeneolamia* spp.) puede causar pérdidas de 8.21 Toneladas de Caña por Hectárea y 5.43 Kilogramos de azúcar por cada un insecto por tallo encontrado (Márquez, J.M., 2012).

Las tres plagas más importantes del cultivo de la caña de azúcar en Guatemala corresponden a la chinche salivosa (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. Hemiptera: *Cercopidae*), la rata cañera (*Sigmodon hirsutus*) y el barrenador del tallo (*Diatraea crambidoides* y *Diatraea saccharalis*. Lepidoptera: *Pyralidae*) (Márquez, J.M. 2014).

También existen otras plagas de mediana importancia y que ocurren en sectores específicos de la zona cañera, pero que también representan una amenaza para el sector azucarero. Entre estas plagas se encuentran el complejo de plagas de la raíz, compuesto por la chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*; Hemiptera: *Cynidae*), presente en el estrato alto (>300 msnm); las gallinas ciegas (*Phyllophaga* spp. Coleoptera: *Scarabeidae*); los gusanos de alambre o coralillos (*Agriotes* spp. Coleoptera: *Elateridae*). También están las termitas subterráneas (*Heterotermes convexionatus*. Isoptera: *Rhynotermitidae*); las taltuzas (*Ortogeomys* spp. Rodentia: *Geomyidae*) y el saltón coludo (*Saccharosydne saccharivora*. Hemiptera: *Delphacidae*) (Márquez, J.M. 2012).

El hongo *M. anisopliae* se ha reportado como patogénico de algunas de las especies de plagas insectiles mencionadas que atacan la caña de azúcar, sobre todo de las especies de chinche salivosa *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. ya que es uno de sus enemigos naturales más importantes (Márquez, J.M. 2012). Debido a lo anterior, los ingenios azucareros han creado laboratorios de producción masiva del hongo, ya que esta alternativa abarata los costos de control de la chinche salivosa en caña de azúcar.

Se han hecho evaluaciones de diferentes cepas de *M. anisopliae* para el control de huevos, ninfas y adultos de *Aeneolamia* spp. Por ejemplo, las cepas PL 43 y

DIECA-0391 han sido evaluadas sobre adultos de *Aeneolamia postica*, las cuales han mostrado ser patogénicas a esta última con DL90 de $2.57e^{16}$ y $2.04e^{15}$ conidios/Ha para DIECA-0391 y PL 43, respectivamente (Badilla, F. *et al.* sf).

En evaluaciones de campo, la cepa PL-43 ha resultado eficiente para reducir las poblaciones de ninfas de chinche salivosa hasta 0.13 ninfas/tallo y un 20 % menos de daño foliar causado por *Aeneolamia* spp. (Márquez, J.M. 2013).

En el caso de el control de huevecillos, la cepa BISA-01 2000 puede llegar a causar hasta un 95 % de mortalidad en esta etapa de desarrollo (Badilla, F. *et al.* sf). Estos resultados se han observado a nivel de campo, ya que al incorporar *M. anisopliae* en el suelo a la labor de aporque a los 9 días después del corte, se han observado reducciones de hasta un 40 % de la primera generación de ninfas de chinche salivosa (Torres, L. & López, E. 2013).

El hongo *Metarhizium anisopliae* también ha sido reportado en Brasil para el control de otras especies de chinche salivosa como lo son las del género *Mahanarva* (Vieira, P. *et al.* 2011). En ensayos de campo en cultivo de caña de azúcar con dos aplicaciones del entomopatógeno se han observado reducciones de las poblaciones de ninfas de chinche salivosa de hasta 91 % (Dinardo, L. 2004).

3.2. Antecedentes

La producción masiva del hongo *Metarhizium anisopliae* es un proceso que conlleva la combinación de varios factores tanto ambientales para su desarrollo como nutricionales para su reproducción. Entre los ambientales se pueden mencionar temperatura, humedad relativa y luminosidad como las tres variables críticas para el desarrollo del hongo. Entre los factores nutricionales, se tiene la calidad del sustrato sobre el que será producido.

Tomando en cuenta el anterior aspecto, gran parte de la producción de conidios, las cuales son las estructuras de reproducción de este hongo depende del sustrato sobre el cual se produzca. Este último debe de proveer principalmente Carbohidratos, Proteínas, Minerales y Vitaminas para lograr una producción de conidios aceptable.

No obstante, en el laboratorio de producción de entomopatógenos del área de Biotecnología del Ingenio Magdalena S.A., se utilizan los granos de arroz para la reproducción de *M. anisopliae*, ya que en evaluaciones previas ha sido el que mejor producción conidial ha presentado. Sin embargo, los granos de arroz poseen una relación C:N de 45:1, lo cual es muy alto en la producción de

entomopatógenos, lo cual causa un desbalance en el aporte de nutrientes sobre el cual se desarrolla el entomopatógeno.

Uno de los nutrientes de los cuales presentan valores no óptimos para el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* en los granos de arroz quebrado es el Nitrógeno, el cual le sirve al hongo para la síntesis de aminoácidos y elaboración de las diferentes proteínas de su estructura. Esto se ve reflejado en una baja concentración de conidios por cada gramo de arroz inoculado y se traduce en una mayor cantidad de arroz inoculado para la formulación de una dosis para aplicación en campo, lo cual incrementa los costos de producción al necesitarse más insumos.

Actualmente, dentro de las metas del laboratorio de entomopatógenos es que la concentración de conidios por gramo de sustrato sea mayor de 4.5⁹, sin embargo esto aún no se ha logrado establecer del todo teniendo valores máximos entre 1.5 y 3.5⁹ conidios/gr, lo cual significa un aumento en los costos de producción para una dosis de *Metarhizium anisopliae*, sobre todo en la cantidad de sustrato.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

- 4.1.1. Evaluar la respuesta a la suplementación con Nitrógeno en diferentes etapas del proceso de producción de 2 cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el Ingenio Magdalena S.A.

4.2. Específicos

- 4.2.1. Cuantificar la producción de conidios/gr de 2 cepas hongo *M. anisopliae* por efecto de la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción.
- 4.2.2. Cuantificar la producción de conidios/gr por efecto de la interacción de la etapa de suplementación con Nitrógeno con las dos cepas del hongo *M. anisopliae*.
- 4.2.3. Determinar el porcentaje de viabilidad de los conidios de 2 cepas del hongo *M. anisopliae* por efecto de la suplementación con Nitrógeno en las diferentes etapas del proceso de producción.
- 4.2.4. Determinar el porcentaje de viabilidad de los conidios por efecto de la interacción entre la etapa de suplementación con Nitrógeno con las dos cepas del hongo *M. anisopliae*.

V. METODOLOGÍA

5.1. Localización

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de producción de hongos entomopatógenos de Ingenio Magdalena S.A., el cual se encuentra dentro de la finca San Patricio cuya ubicación geográfica se encuentra en el municipio de La Democracia, al Suroeste de Escuintla a 106 Kilómetros de la ciudad capital. Esta finca está ubicada a una altura de 48 msnm, con una latitud Norte de 14°06'14", longitud oeste de 90°57'39" (Ingenio Magdalena S.A. 2013).

5.2. Condiciones climáticas

Las condiciones climáticas de la Finca San Patricio para los últimos 5 años se detallan en el Cuadro 2:

Cuadro 1. Promedio de variables climáticas de los años 2009-2013 de la Finca San Patricio.

| Variable | Valor |
|--|-----------|
| a. Temperatura media anual (°C) | 26.57 |
| b. Humedad relativa | 78.12 % |
| c. Dirección del viento (Km/H) | 6.64 |
| d. Radiación solar (W/m ² /día) | 19,262.68 |
| e. Precipitación anual (mm) | 1,892 |

Fuente: Estación Automática Bugarvilia, Ingenio Magdalena. S.A.

5.3. Descripción de los tratamientos a evaluar

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos a evaluar para la suplementación con Nitrógeno en diferentes etapas del proceso de producción de dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae*.

| Tratamiento | Descripción | % Nitrógeno (p/p) | Cepa |
|-------------|-------------------------------------|-------------------|--------------|
| T1 | Nitrógeno en la etapa matriz | 0.65 | BISA-01 2000 |
| T2 | Nitrógeno en la etapa inoculación | 0.65 | BISA-01 2000 |
| T3 | Nitrógeno en la etapa de desarrollo | 0.65 | BISA -012000 |
| T4 | Testigo sin Nitrógeno | 0 | BISA -012000 |
| T5 | Nitrógeno en la etapa matriz | 0.65 | PL-43 |
| T6 | Nitrógeno en la etapa inoculación | 0.65 | PL-43 |
| T7 | Nitrógeno en la etapa de desarrollo | 0.65 | PL-43 |
| T8 | Testigo sin Nitrógeno | 0 | PL-43 |

En el Cuadro 2, se detallan los tratamientos evaluados. En total se evaluaron 8 tratamientos, los cuales corresponden a suplementación con Nitrógeno en diferentes etapas del proceso de producción para las dos cepas ya mencionadas y sus testigos relativos. Cada tratamiento se replicó 4 veces para hacer un total de 32 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió en una bandeja plástica de 70 cm de largo por 50 cm de ancho, en la cual se colocó el contenido de 16 bolsas de *Metarhizium* previamente esporulado en bolsas de plástico.

En el caso de los tratamientos 4 y 8 (Testigos sin N) consistieron en la metodología convencional que se realiza actualmente en el laboratorio.

5.4. Diseño experimental

Se estableció un experimento con estructura factorial de 2x4 bajo un diseño completamente al azar debido a que dentro del área de estudio se tiene homogeneidad de condiciones.

El Modelo estadístico fue el siguiente (López, E. 2008):

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} : respuesta observada en la ij – ésima unidad experimental.

μ : Media general de los tratamientos

α_i : Efecto del i – ésimo nivel del factor suplementación

β_j : Efecto del j – ésimo nivel del factor cepa

$(\alpha\beta)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el i – ésimo nivel del factor suplementación y el j – ésimo nivel del factor cepa

ϵ_{ij} : Error experimental asociado a la ij – ésima unidad experimental.

5.5. Manejo del experimento

5.5.1. Preparación del inóculo primario. Para la preparación de los inóculos primarios se destinaron los siguientes materiales:

- Cajas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro
- 1 L de agua
- 15 gr de agar
- 20 gr de dextrosa
- 70 gr de habas
- Beakers de vidrio de 500 ml
- Autoclave

La preparación del medio de cultivo para el desarrollo de *M. anisopliae* consistió en hervir las habas en el litro de agua hasta ablandarse, luego se removieron las testas y se procedieron a licuar. Luego de licuarse, la solución de habas más agua se colocó en beakers y se calentaron en una estufa. Cuando la temperatura llegó

a 40 °C se agregaron los 20 gr de dextrosa y los 15 g de agar. Se removieron constantemente hasta llegar a 70 °C. Luego de esto se sirvieron en las cajas Petri de vidrio para luego esterilizarlas en una autoclave a una temperatura de 121 °C durante 30 minutos. Luego de esterilizarse, se agregaron 1 gr de Sulfato de Estreptomicina y se almacenaron a 4°C en refrigeración.

5.5.2. Preparación de las matrices líquidas. Las matrices líquidas constituyeron la base de la inoculación de las bolsas de polietileno con los granos de arroz. Para ello se utilizaron los siguientes materiales:

- Erlenmeyer de 1 L
- 1000 ml de agua desmineralizada
- Dispersante Tween 80
- 25 mg de Cloranfenicol
- 25 mg de Tetraciclina
- 2 gr de glucosa
- 5 gr de levadura de cerveza
- 2.5 gr de peptona de caseína
- 0.1 gr de saboroud
- Aluminio en láminas
- Algodón humedecido
- 1 máquina agitadora

Para elaborar la matriz líquida los 800 ml de agua desmineralizada de vertieron en el erlenmayer, luego se agregaron los demás ingredientes. Posteriormente, se procedió a tapar con algodón humedecido y cubrir con aluminio la tapa del erlenmeyer y se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 PSI durante 40 minutos. Luego se colocó en una agitadora y se agitó durante 48 horas a 160 rpm. La solución se completó con 200 ml de agua desmineralizada para obtener 1 L.

5.5.3. Preparación del sustrato. El sustrato a utilizado consistió en granos de arroz, el cual se sometió a un proceso de ablandamiento en agua a 80 °C durante 2 minutos. Posteriormente se escurrió para quitar el exceso de humedad.

Para cada tratamiento, se destinaron 64 bolsas de polietileno transparentes. Se pesaron 350 gr de sustrato por cada bolsa y luego estas se engraparon. Las bolsas con el sustrato se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 PSI durante 30 minutos.

5.5.4. Inoculación. Luego de esterilizadas las bolsas se trasladaron para ser inoculadas. Para ello se utilizaron las matrices líquidas previamente agitadas. Mediante un inoculador se agregaron 16 ml de la solución de matriz que contenía el hongo *M. anisopliae* a cada una de las bolsas de polietileno con los 350 gr de arroz previamente cocidos y esterilizados.

Después de inoculadas, las bolsas se homogenizaron manualmente para distribuir el hongo en todo el sustrato.

5.5.5. Desarrollo de micelio. Las bolsas se trasladaron a salas de desarrollo después de ser homogenizadas. Estas se ubicaron en estantes con una superficie de duroport. Las condiciones ambientales de la sala fueron de 24 °C para la temperatura, 60 % de humedad relativa y foto fase de 12:12 L-O. En esta etapa se realizó la respectiva ruptura de micelio a los 4, 8 y 12 días después de inoculadas, lo cual consistió en mover manualmente la bolsa y hacer movimientos de des compactación, con esto se pretende liberar las esporas que vayan produciéndose.

5.5.6. Secado. Después de 12 días en la salas de desarrollo, las bolsas se trasladaron a la salas de secado. Para ello el contenido de las 16 bolsas se vació en bandejas de plástico de 70 cm de largo por 50 de ancho. Estas se colocaron en estantes de metal con superficie de duroport. La temperatura en esta etapa de 28 °C y la humedad relativa de 40 % y foto fase de 12:12 L-O. Esta fase duró 8 días.

5.5.7. Cosecha. Después del secado del hongo, se procedió a cosechar y el hongo obtenido se empacó en bolsas de papel kraft de 2 kg. De capacidad y luego se almacenó en cuarto frío a una temperatura de 4°C.

5.6. Aplicación del Nitrógeno

Se procedió a realizar un análisis bromatológico a los granos de arroz entero utilizados en el laboratorio para determinar la relación Carbono:Nitrógeno. La fuente de Nitrógeno utilizada fue Urea (46 % de Nitrógeno), la cual se agregó en una cantidad de 5 gr por cada 350 gr de arroz contenido en las bolsas de polietileno para mantener una relación C:N de 30:1 tomando como base el análisis bromatológico realizado al sustrato.

Para el caso de la suplementación en la matriz, el Nitrógeno se agregó después de esterilizada en autoclave y se agitó las 48 horas en la agitadora.

En el caso de la suplementación al momento de la inoculación, el Nitrógeno se agregó en el recipiente del inoculador diluido en 200 ml de agua que se utilizaron para completar la matriz líquida de *M. anisopliae*.

Por último, el tratamiento de suplementación en la fase de desarrollo, la urea se diluyó en agua y se inyectó a las bolsas por medio de una jeringa estéril la cantidad de 5 gr por bolsa.

5.7. Variables respuesta

5.7.1. Concentración de conidios/gr. Para determinar la concentración de conidios del hongo *M. anisopliae*, posterior a la fase de secado, se tomó una muestra aleatoria compuesta de 10 gr de arroz esporulado por el hongo ya secado en las bandejas de plástico. Estos 10 gr se diluyeron en 1 L de agua desmineralizada + 1 ml de dispersante Tween 80. Estos se agitaron durante 5 minutos.

Luego de agitado, se hizo una dilución 0.001 %, para ello se tomó con una pipeta 1 ml de la solución de *M. anisopliae* y se diluyó en 9 ml de agua desmineralizada, de esta dilución se tomó 1 ml y se diluyeron en otros 9 ml de agua para obtener una solución final al 0.0001 %.

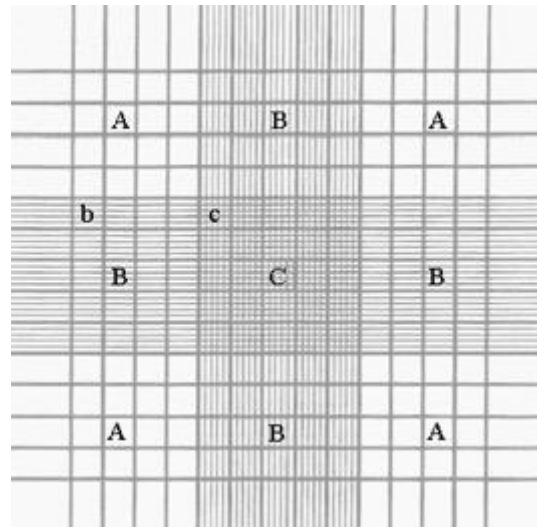
De la solución final se tomó una alícuota de 1 μ L, la cual se colocó en una cámara de Neubauer de 8 cuadrantes (solo se contaron las conidios de los A) y 16 campos por cuadrante (Ver Figura 9) previamente lavada. Al llenarse los cuadrantes, se colocó un cubreobjetos con la ayuda de un microscopio óptico con un aumento de 20 x y se contaron los conidios por cada uno de los 8 cuadrantes de cada uno de los 16 campos. Se realizó una lectura para realizar lo anteriormente descrito. La concentración de conidios/g se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$C = 10,000 * M * 500 * 10 * 10/10$$

En donde:

M: Promedio de conidios de los 8 cuadrantes

Figura 10. Diagrama de la cámara de Neubauer para realizar el conteo de conidios.



5.7.2. Porcentaje de viabilidad de conidios. Para determinar la viabilidad de los conidios, se sembraron 5 alícuotas de cada tratamiento de 5µl de una suspensión de conidios con una concentración de 10^6 conidios/ml en medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Luego estas se Incubaron a 20 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se agregó azul de lactofenol para detener la germinación. Se cortó la porción de agar conteniendo la alícuota de la suspensión de conidios y se colocó sobre una lámina portaobjetos y se observó en el microscopio. Este procedimiento fue realizado posterior a la fase de secado.

Se registró el número de conidios germinados, el criterio para ello consistió en contar aquellas cuyo tubo germinativo fuera dos veces mayor al diámetro del conidio. El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$V = \frac{C_g}{C_t} * 100.$$

En donde:

V: Porcentaje de viabilidad de conidios

C_g: Total de conidios germinadas

C_t: Total conidios observadas

5.8. Análisis de la información

Las variables descritas anteriormente se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) con la ayuda del paquete estadístico INFOSTAT, versión 2012, de la

Universidad de Córdoba. Las medias de los tratamientos se sometieron a una prueba múltiple bajo el estadístico de Tukey al 5 % de significancia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Concentración de conidios/gr

En el Cuadro 3, se muestran los resultados del análisis de varianza para un modelo bifactorial en un diseño completamente al azar realizado para la variable concentración de conidios/gr, para cada uno de los tratamientos evaluados bajo este modelo estadístico. Se puede observar que existe significancia estadística ($P < 0.05$) tanto en los factores cepa y suplementación, como en la interacción de estas mismas.

Cuadro 3. Análisis de varianza bifactorial realizado a los tratamientos evaluados.

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Concentración | 32 | 0.98 | 0.97 | 14.37 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------------------|------------|----|------------|--------|---------|
| Modelo. | 6.04E+19 | 7 | 8.63E+18 | 153.98 | <0.0001 |
| Cepa | 4.9116E+17 | 1 | 4.9116E+17 | 8.76 | 0.0068 |
| Suplementación | 5.03E+19 | 3 | 1.68E+19 | 299.28 | <0.0001 |
| Cepa*Suplementación | 9.60E+18 | 3 | 3.20E+18 | 57.08 | <0.0001 |
| Error | 1.34E+18 | 24 | 5.6039E+16 | | |
| Total | 6.17E+19 | 31 | | | |

Mientras que, en el Cuadro 4 y Figura 11, se muestra el resultado de la comparación múltiple de medias bajo el estadístico de Tukey a 5 % de significancia para la variable anteriormente descrita realizado a los tratamientos evaluados, los cuales constituyen la interacción entre la cepa del hongo *Metarhizium anisopliae* y la etapa del proceso de producción en que se agregó Nitrógeno.

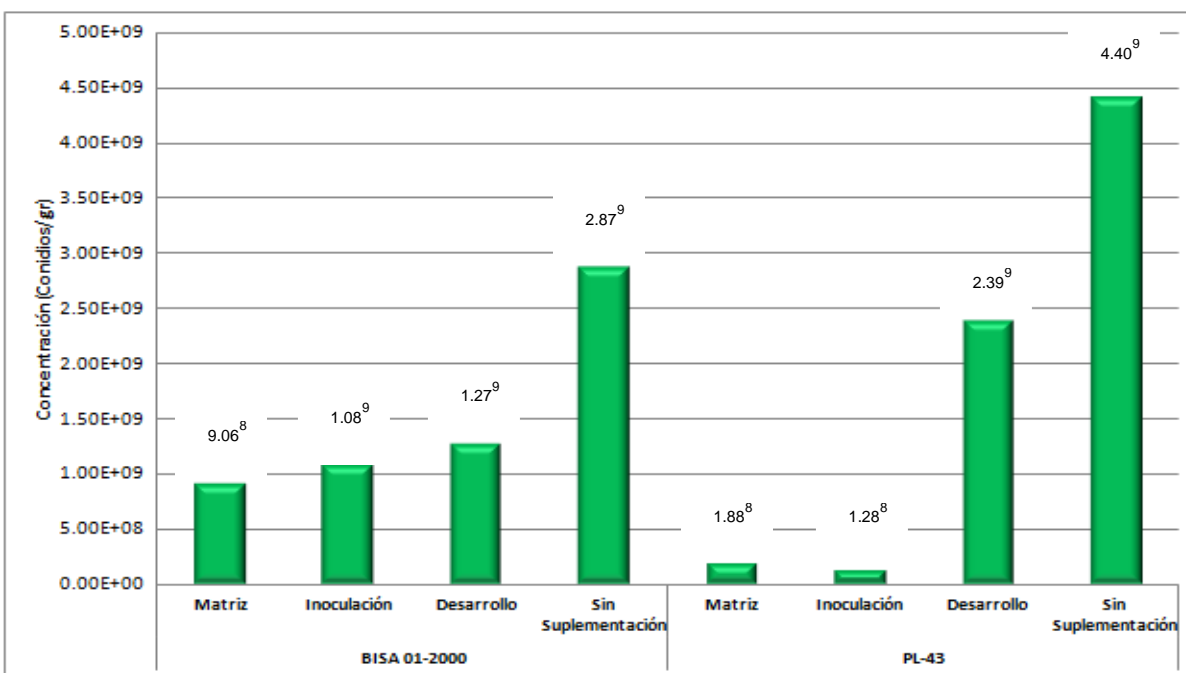
El mejor tratamiento que superó estadísticamente al resto ($p < 0.05$) fue el testigo sin suplementar de la cepa PL-43 (T8), el cual constituye la metodología convencional que utiliza el laboratorio de entomopatógenos de Ingenio Magdalena para la producción del micro organismo. En la siguiente categoría estadística se encontró que el testigo sin N de la cepa BISA 01-2000 (T4) y la suplementación en la etapa de desarrollo en la cepa PL-43 (T8) no difirió estadísticamente. Por último, estuvieron los tratamientos suplementados con Nitrógeno al 0.65 % p/p (5 gr de Urea por cada 350 gr de arroz) en la etapa de desarrollo de la cepa BISA 01-2000

(T3) y los suplementados en las etapas de matriz e inoculación de ambas cepas (T2, T1, T6 y T7).

Cuadro 4. Comparación estadística entre los tratamientos evaluados para la variable concentración de conidios/gr. Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Tratamiento | Cepa | Etapas | Concentración de Conidios/gr | Grupo Tukey (0.05) |
|-------------|--------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| T8 | PL-43 | Sin Suplementación | 4.41 ⁹ | A |
| T4 | BISA 01-2000 | Sin Suplementación | 2.87 ⁹ | B |
| T7 | PL-43 | Desarrollo | 2.39 ⁹ | B |
| T3 | BISA 01-2000 | Desarrollo | 1.27 ⁹ | C |
| T2 | BISA 01-2000 | Inoculación | 1.08 ⁹ | C |
| T1 | BISA 01-2000 | Matriz | 9.06 ⁸ | C |
| T5 | PL-43 | Matriz | 1.88 ⁸ | D |
| T6 | PL-43 | Inoculación | 1.28 ⁸ | D |

Figura 11. Efecto de la suplementación con Nitrógeno en las distintas etapas del proceso de producción de las dos cepas de *M. anisopliae* sobre la producción de conidios/gr.



Se puede observar de manera general, que los tratamientos de ambas cepas evaluadas que no recibieron suplementación con Nitrógeno en alguna etapa del proceso de producción superaron estadísticamente a los tratamientos que recibieron el Nitrógeno, de acuerdo con Tortora (1993) citado por Rodríguez *et al.*

(2002), probablemente pudo deberse a las reacciones que provienen del efecto amonificador de la Urea en el sustrato utilizado, lo cual pudo haber afectado la fisiología de la producción de conidios por parte del hongo. Esto puede corroborarse con la prueba de medias que abarca el factor suplementación de forma individual (Cuadro 5 y Figura 12).

Así también, específicamente a nivel de cepa, tanto la BISA01-2000 y la PL-43 no se observó un incremento significativo en la concentración de conidios/gr utilizando Urea como fuente de Nitrógeno para la suplementación de *Metarhizium anisopliae*

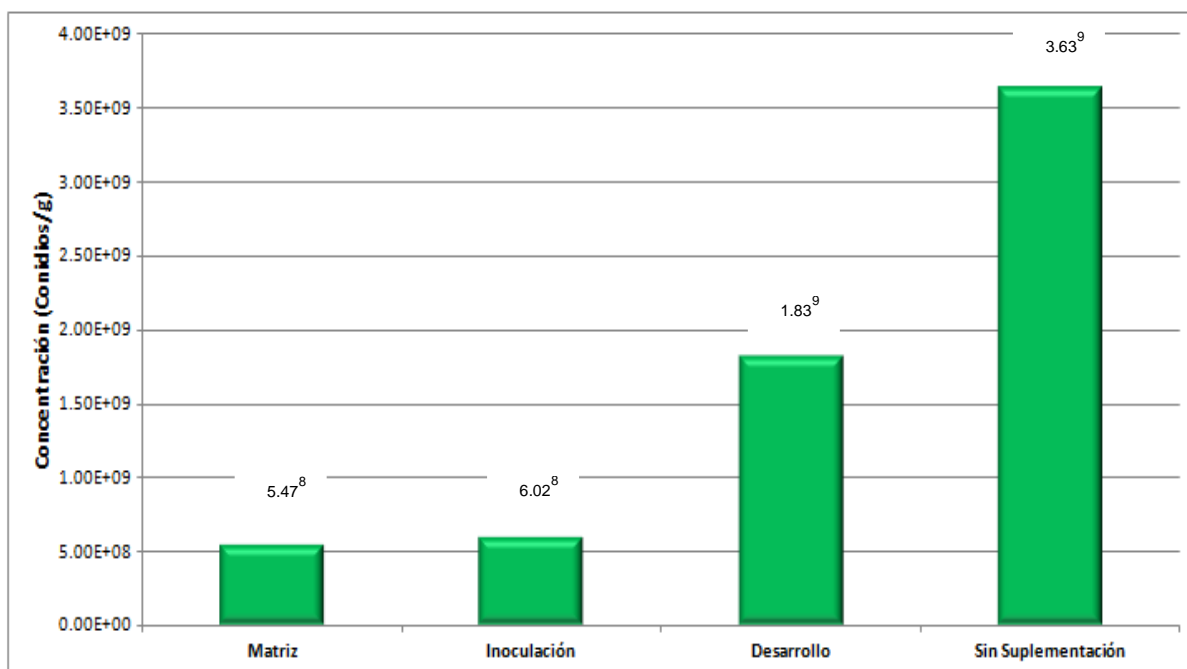
De acuerdo con Rodriguez *et al.* (2002), Es posible que el efecto detrimental en la producción de conidios en los tratamientos suplementados por Nitrógeno pueda deberse al efecto de amonificación que ejerce la Urea sobre el sustrato sobre el que se desarrollan los hongos, en este caso el arroz, ya que la amonificación aumenta el pH del mismo, lo cual puede causar un efecto fungistático en algunas especies de hongos, con lo que esto puede ser aplicable en el caso de *Metarhizium anisopliae* de acuerdo con los resultados obtenidos.

Los resultados difieren de lo indicado por Moore (1996), quien cita que la Urea es una de las mejores fuentes de Nitrógeno para inducir la esporulación de los hongos entomopatógenos, por lo cual es conveniente corroborar otras fuentes de Nitrógeno para validarlo.

Cuadro 5. Comparación estadística de la suplementación con Nitrógeno las distintas etapas del proceso de producción de *M. anisopliae* para la variable concentración de conidios/gr. Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Etapa | Concentración de Conidios/gr | Grupo Tukey (0.05) |
|------------------|------------------------------|--------------------|
| Testigo Relativo | 3.63 ⁹ | A |
| Desarrollo | 1.83 ⁹ | B |
| Inoculación | 6.02 ⁸ | C |
| Matriz | 5.47 ⁸ | C |

Figura 12. Efecto del factor suplementación con Nitrógeno sobre la concentración de conidios/gr del hongo *M. anisopliae*.

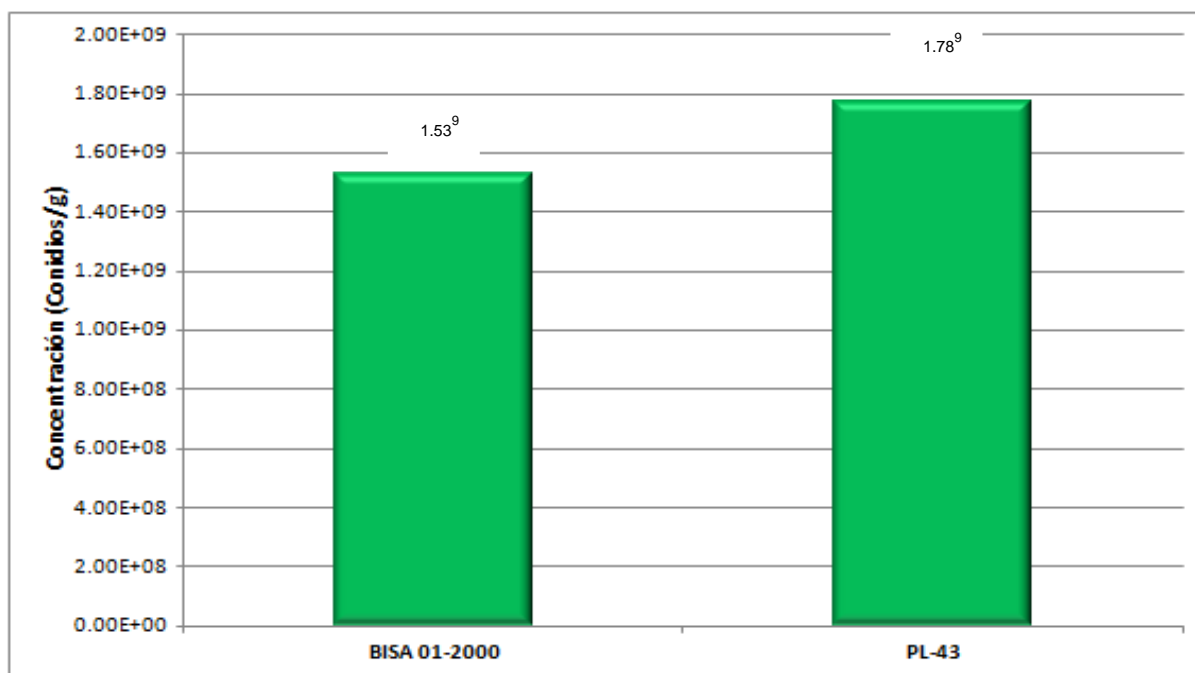


Mientras tanto en la Figura 13, se observa la producción de conidios/gr de ambas cepas. En el Cuadro 6, se indica que la cepa PL-43 superó estadísticamente ($P < 0.05$) en cantidad de conidios/gr a la cepa BISA 01-2000 lo cual demuestra que la cepa PL-43 tiene una mayor capacidad de producir esporas respecto a la cepa BISA 01-2000 bajo las condiciones del experimento. Lo cual puede constituir un factor a tomar en cuenta para la producción masiva del entomopatógeno.

Cuadro 6. Comparación estadística de las dos cepas de *M. anisopliae* evaluadas para la variable concentración de conidios/gr. Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Cepa | Concentración de Conidios/gr | Grupo Tukey (0.05) |
|--------------|------------------------------|--------------------|
| PL-43 | 1.78 ⁹ | A |
| BISA 01-2000 | 1.53 ⁹ | B |

Figura 13. Efecto del factor cepa sobre la concentración de conidios/gr del hongo *M. anisopliae*.



B. Viabilidad

En el Cuadro 7 se aprecia el análisis de varianza realizado para la viabilidad de los conidios producidas por los tratamientos evaluados. Existió un efecto significativo ($p < 0.05$) entre la interacción de la cepa y la suplementación y esta última como un factor independiente.

Cuadro 7. Análisis de varianza bifactorial realizado a los tratamientos evaluados para la variable Viabilidad de conidios.

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|--------------|----|----------------|-------------------|------|
| % Viabilidad | 32 | 0.54 | 0.41 | 4.26 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

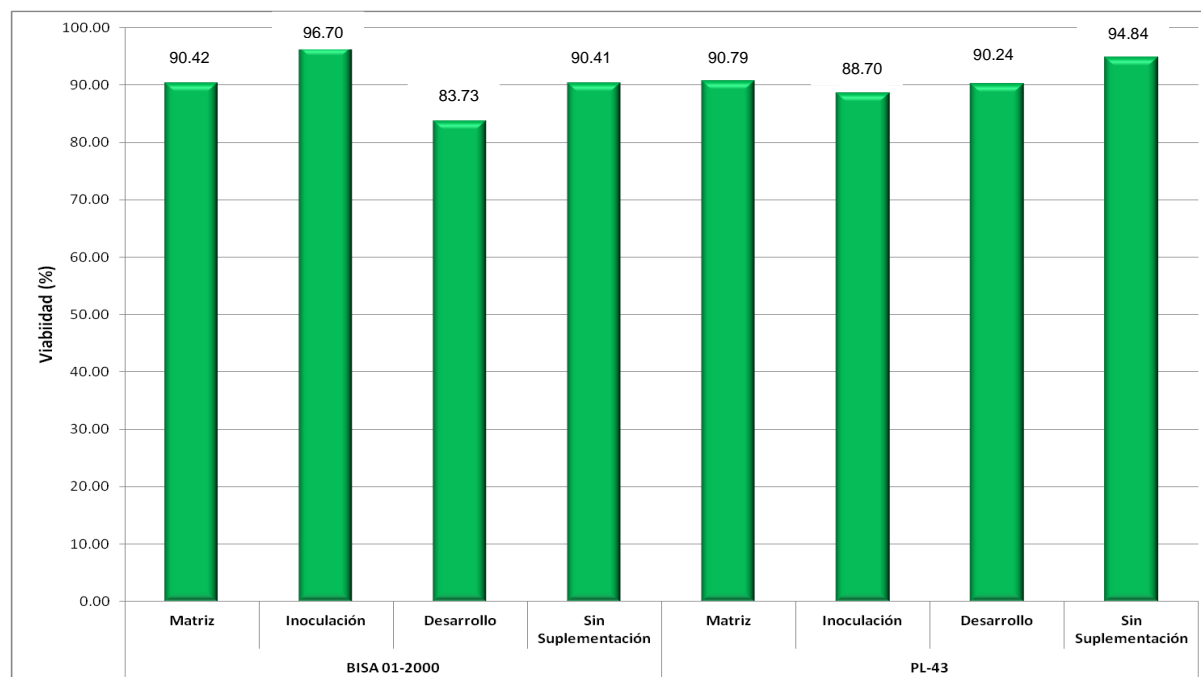
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------------------|--------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 423.68 | 7 | 60.53 | 4.05 | 0.0046 |
| Cepa | 5.53 | 1 | 5.53 | 0.37 | 0.5486 |
| Suplementación | 171.68 | 3 | 57.23 | 3.83 | 0.0225 |
| Cepa*Suplementación | 246.46 | 3 | 82.15 | 5.5 | 0.0051 |
| Error | 358.34 | 24 | 14.93 | | |
| Total | 782.01 | 31 | | | |

Por su parte, en la Figura 14, se observa el efecto que tuvo cada uno de los tratamientos evaluados sobre la viabilidad de las conidios producidas por el hongo *Metarhizium anisopliae*. Los resultados se corroboran en el Cuadro 8, en el cual se presenta los resultados de la comparación múltiple de medias con el estadístico de Tukey, en el que se aprecia que la interacción de la Cepa PL-43 sin suplementación con Nitrógeno (T8) junto con la suplementación en la inoculación de la cepa BISA-01 2000 (T2), mostraron un porcentaje de viabilidad de conidios superiores al resto de tratamientos.

Cuadro 8. Comparación estadística entre los tratamientos evaluados para la variable viabilidad de conidios. Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Tratamiento | Cepa | Etapas | % Viabilidad | Grupo Tukey (0.05) |
|-------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|
| T2 | BISA 01-2000 | Inoculación | 96.70 | A |
| T8 | PL-43 | Sin suplementación | 94.84 | A |
| T5 | PL-43 | Matriz | 90.80 | AB |
| T1 | BISA 01-2000 | Matriz | 90.42 | AB |
| T4 | BISA 01-2000 | Sin suplementación | 90.41 | AB |
| T7 | PL-43 | Desarrollo | 90.25 | AB |
| T6 | PL-43 | Inoculación | 88.71 | AB |
| T3 | BISA 01-2000 | Desarrollo | 83.74 | B |

Figura 14. Efecto de la suplementación con Nitrógeno en las distintas etapas del proceso de producción de las dos cepas de *M. anisopliae* sobre la viabilidad de conidios.

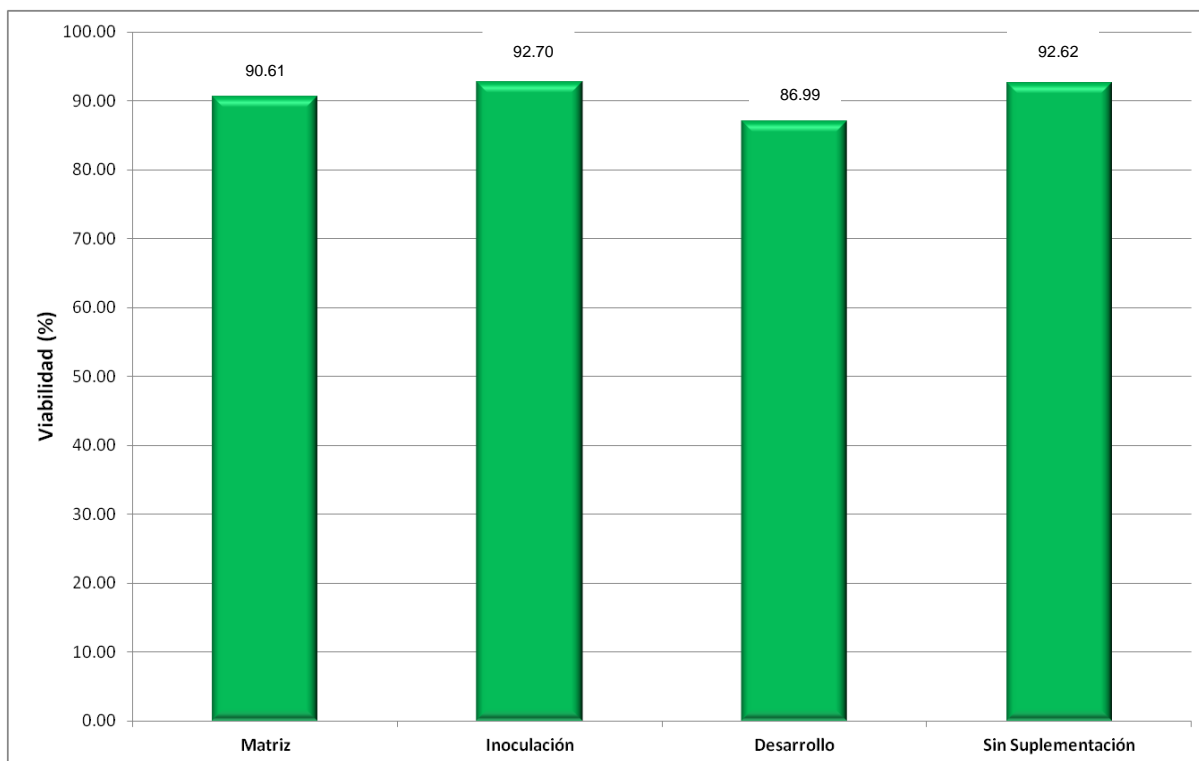


En la Figura 15 se observa el efecto de la suplementación con Nitrógeno sobre la viabilidad de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae*. La etapa de desarrollo fue la que mostró la menor viabilidad al mostrar un valor menor al 90 % (86.99 %), esto es probablemente debido a un efecto inhibitorio por acción de la amonificación provocada por la urea utilizada como fuente de Nitrógeno sobre las conidios producidas en los 4 días previos a la suplementación. Mientras que los dos testigos sin Nitrógeno junto con la suplementación en la fase de inoculación se mostraron como los tratamientos superiores en cuanto a la viabilidad de conidios del hongo (ver Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación estadística de la suplementación con Nitrógeno las distintas etapas del proceso de producción de *M. anisopliae* para la variable viabilidad de conidios Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Etapa | Concentración de Conidios/g | Grupo Tukey (0.05) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| Inoculación | 92.70 | A |
| Sin Suplementación | 92.62 | A |
| Matriz | 90.61 | AB |
| Desarrollo | 86.99 | B |

Figura 15. Efecto del factor etapa de suplementación con Nitrógeno sobre la viabilidad de conidios del hongo *M. anisopliae*.

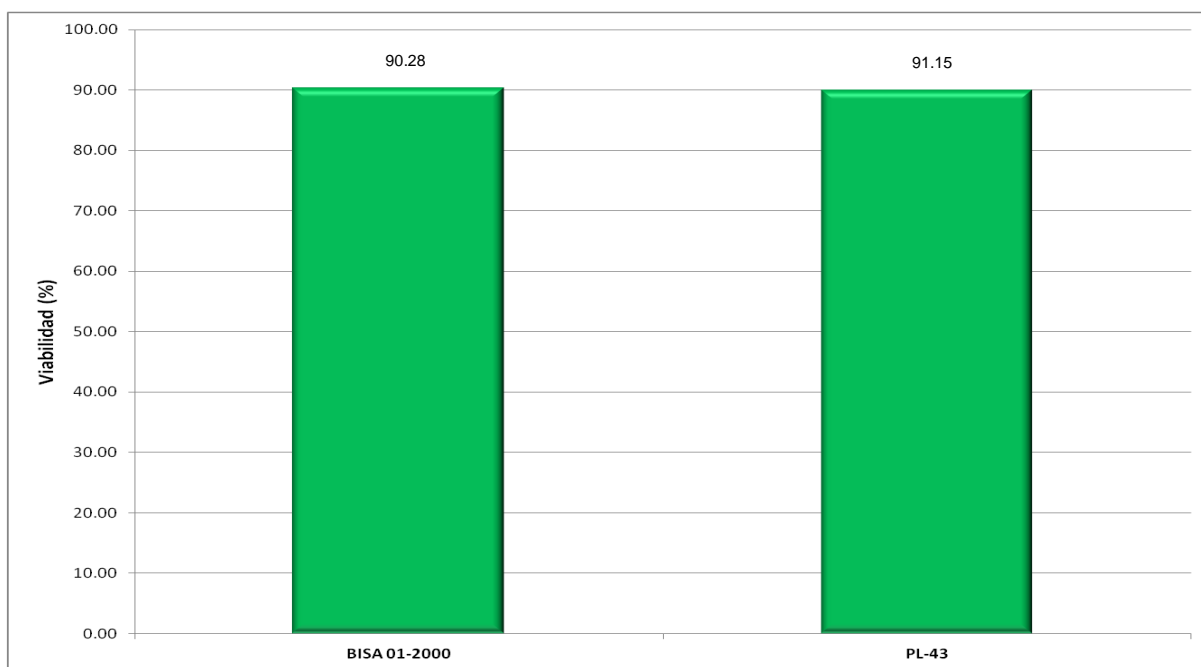


Mientras que no se encontró diferencias significativas entre la cepa PL-43 y BISA-01 2000 para la viabilidad de los conidios, por lo que la variable concentración de conidios/gr es más determinante en este sentido para la formulación de las dosis del hongo independientemente de la cepa utilizada (ver Figura 16 y Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación estadística de las dos cepas de *M. anisopliae* evaluadas para la variable viabilidad de conidios. Tratamientos con una letra distinta difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

| Cepa | % Viabilidad | Grupo Tukey (0.05) |
|--------------|--------------|--------------------|
| PL-43 | 91.15 | A |
| BISA 01-2000 | 90.32 | A |

Figura 16. Efecto del factor cepa sobre la viabilidad de conidios del hongo *M. anisopliae*.



VII. CONCLUSIONES

1. La suplementación utilizando urea como fuente de Nitrógeno no produjo una respuesta incremental de la concentración de conidios/g tanto de la cepa PL-43 como de la cepa BISA-01 2000 del hongo *Metarhizium anisopliae* en las diferentes etapas del proceso de producción masiva del hongo al reducir la producción de conidios respecto a los testigos sin suplementación con Nitrógeno.
2. La suplementación con Nitrógeno mostró una reducción significativa de la viabilidad de las conidios cuando se realizó en la etapa de desarrollo del hongo *Metarhizium anisopliae*, mientras que la suplementación en la etapa de preparación de la matriz e inoculación no difirieron estadísticamente de los testigos sin Nitrógeno en las dos cepas evaluadas.
3. La cepa PL-43 superó estadísticamente en concentración de conidios/gr (4.4^9) a la cepa BISA-01 2000 con unan viabilidad de conidios de 97 % en la etapa de Inoculación y 95 % sin suplementación de Nitrógeno.
4. La viabilidad de conidios no difirió estadísticamente en las dos cepas evaluadas.
5. La interacción entre la etapa de suplementación con las dos cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* evaluadas no mostraron una incidencia significativa en la concentración de conidios/gr utilizando Urea como fuente de Nitrógeno.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar otras fuentes de Nitrógeno como Nitrato de Calcio, Nitrato de Potasio, Sulfato de Amonio y aminoácidos para corroborar el efecto fungistático de la amonificación proveniente de la urea.
2. Evaluar la suplementación con Nitrógeno a otros sustratos distintos a los granos de arroz para corroborar el efecto sobre la producción y viabilidad de conidios del hongo *Metarhizium anisopliae*.
3. Evaluar diferentes concentraciones de Nitrógeno en la suplementación para la producción de *Metarhizium anisopliae*.
4. Realizar un análisis bromatológico de los granos de arroz posterior a la suplementación con Nitrógeno y los aditivos de la matriz líquida.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, N. 2006. *Determinación del efecto de algunas fuentes de Carbono y Nitrógeno, del pH y la actividad de agua sobre el desarrollo de Nomourea riley*. Tesis Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 133 págs.
2. Arana, E. 2011. *Análisis del proceso de producción del plaguicida biológico Metarhizium anisopliae*. Tesis Ing. Q.Q. USAC. Guatemala, 132 págs.
3. Asociación de Azucareros de Guatemala, 2014. *Economía de la Agroindustria Azucarera*. <http://www.azucar.com.gt/economia3.html> [02 marzo 2014].
4. Bidochka, M., G. Khachatourians, 1991. *The implication of metabolic acids produced by Beauveria bassiana in pathogenesis of the migratory grasshopper, Melanoplus sanguinipes*. Journal of Invertebrate Pathology 58:106-117.
5. Bustillo, A. 2001. *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia*. En: *seminario Uso de entomopatógenos en Colombia*. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. págs. 30-53.
6. Cañedo, V., Ames, T. 2004. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. Lima. 68 págs.
7. Castillo S. 2006. *Uso de Metarhizium anisopliae para el control biológico del salivazo (Aeneolamia spp. Y Prosapia spp.) en pastizales de Barachiaria decumbens en El Peten, Guatemala*. Tesis. Escuela de posgrado CATIE. Turrialba, Costa Rica. 68 págs.
8. Dinardo-Miranda, L. et al. 2004. *Eficiência de Metarhizium anisopliae (Metsch.) no Controle de Mahanarva fimbriolata (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em Cana-de-Açúcar*. Neotropical Entomology [Brasil]. 33(6): 743-749.
9. Li, D. Holdon, D. 1995. *Effects of nutrients on colony formation, growth and sporulation of M. anisopliae*. <http://eurekamaq.com/research/031/171/influences-nutrients-colony-formation-growth-sporulation-metarhizium-anisopliae.php> [20 marzo 2014].
10. Ingenio Magdalena S.A. 2010. *Manual para el Manejo Integrado de Plagas*. Departamento de Fitosanidad. 20 págs.


11. Ingenio Magdalena S.A. *Histórico Bugarvilia. Base de Datos Meteorología*. Documento de Microsoft Excel 2007.
12. Lecuona, R.E, ed. 1996. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Buenos Aires, 338 págs.
13. Márquez, J. M. 2012. *El Manejo Integrado de Plagas. En: El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala*, de Mario Melgar et al. Guatemala: Artemis Edinter. Págs. 203-231.
14. Márquez, J.M. 2013. *Eficiencia del control microbiológico de chinche salivosa: Nuevas cepas de hongos entomopatógenos para el control de ninfas y adultos*. En: Resultados de investigación en manejo integrado de plagas zafra 2012-2013 de CENGICAÑA. Págs. 14-25.
15. Monzón, A. 2001. *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el uso de productos fitosanitarios no sintéticos*. Manejo Integrado de Plagas CATIE [Costa Rica]. 63(1): 95-113.
16. Moore, E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. Cuarta Edición. Prentice Hall. New Jersey. 574. Págs.
17. Pedrini, N., R. Crespo, M.P. Juárez, 2007. *Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 146(1): 124-137.
18. Pincirolí, M. 2010. *Proteínas de arroz Propiedades funcionales y estructurales*. Tesis. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Centro de Investigación y Desarrollo en Crio tecnología de Alimentos. 93 págs.
19. Reyes, A. López, E. 2013, *Determinación de la cantidad de inóculo necesario para la producción de matrices del hongo Metarhizium anisopliae*. Ingenio Magdalena S.A. 3 págs.
20. Rodríguez, N. et al. 2002. *Efecto de la amonificación con urea sobre el pH y la presencia de microorganismos en heno de Brachiaria humidicola (Rendle) Shweick*. Revista Científica [Venezuela] 12(2): 572-574.
21. Sterling, A. et al. 2011. *Patogenicidad de Metarhizium anisopliae (Deuteromycota: Hyphomycetes) sobre Heterotermes tenuis (Isoptera:*

Rhinotermitidae) en *Hevea brasiliensis*. Revista Colombiana de Entomología 37(1): 36-42.


22. Tanada, Y. H. K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. San Diego, California. 666p.
23. Torres, L., López, E. 2013. *Efecto del aporque temprano más la incorporación del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de ninfas de chinche salivosa *Aeneolamia* spp. En el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Ingenio Magdalena S.A. IMSA. 3p.*

X. ANEXOS

Figura 17. Análisis bromatológico realizado a los granos de arroz utilizado como sustrato para la producción masiva del hongo *M. anisopliae* en Ingenio Magdalena S.A.



Elaborado por: Aura Marina de Marroquin
Autorizado por: Lic. Miguel Angel Rodenas



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Escuela de Zootecnia
Unidad de Alimentación Animal

FORMULARIO BROMATO 7

INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS

Edificio M6, 2° Nivel, Ciudad Universitaria zona 12
Ciudad de Guatemala
Teléfax: 24188307 Teléfono: 24188307 ext 1676
E-mail: bromato2000@yahoo.es

Solicitado por: INGENIO MAGDALENA Dirección: CIUDAD, GUATEMALA No. 338

Fecha de recibida la muestra: 26-06-2014 Fecha de realización: DEL 01 AL 04-07-2014

| Reg. | Descripción de la muestra | BASE | Agua % | M.S.T. % | E.E. % | F.C. % | PROTEINA CRUDA % | Cenizas % | E.L.N. % | Calcio % | Fósforo % | F.A.D. % | F.N.D. % | Lignina % | Dig. Pepsina % | Dig. K.O.H. | T.N.D. % | E.B. Cal/Kcal |
|------|---------------------------|---------------|--------|----------|--------|--------|------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------------|-------------|----------|---------------|
| 446 | MUESTRA DE ARROZ | SECA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| | | COMO ALIMENTO | --- | --- | 0.35 | --- | 7.69 | --- | --- | --- | --- | 22.70 | 56.25 | 8.00 | --- | --- | --- | --- |
| | | SECA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| | | COMO ALIMENTO | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | SECA | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | COMO ALIMENTO | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | SECA | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | COMO ALIMENTO | | | | | | | | | | | | | | | | |

OBSERVACIONES:
Dichos resultados fueron calculados en base a materia seca total y fresca. Se prohíbe la producción parcial de total de este informe, para mayor información comunicarse al teléfono 24188307.

[Signature]
Lic. Hans A. Maya R.
Laboratorista

[Signature]
Lic. Miguel Angel Rodenas
Jefe Laboratorio de Bromatología

TOTAL DE MUESTRAS REPORTADAS EN ESTA HOJA 1

Resultados 2014/338
04/07/14

Cuadro 11. Cálculos de la cantidad de Urea por cada 350 gramos de arroz para suplementar

| PB | FDN | FDA | LDA | EE | C | |
|---------------------------|-------|-------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| 7.49 | 56.25 | 22.70 | 8.00 | 0.35 | 54.98 | |
| Cantidad por Bolsa | | | | | | |
| C | N | C:N | N requerido | N por bolsa | Urea g/bolsa | Urea g/Matriz |
| 54.98 | 1.80 | 30.55 | 1.8 | 2.11 | 5.00 | 320 |

Cuadro 12. Cronograma de actividades durante la investigación

| Actividad | Julio | Agosto | Enero |
|---------------------------------|-------|--------|-------|
| Producción de inóculo primario | X | | |
| Preparación del sustrato | X | | |
| Preparación de matrices | X | | |
| Inoculación | X | | |
| Desarrollo y ruptura de micelio | X | | |
| Secado | X | | |
| Conteo de conidios/gr | | X | |
| Conteo de viabilidad | | X | |
| Cosecha | | X | |
| Análisis de la información | | X | |
| Presentación de resultados | | | X |