

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación y producción de cepas nativas del hongo
Metarhizium anisopliae, para el control de la chinche salivosa
(*Aeneolamia sp*) de la caña de azúcar a nivel de laboratorio

Trabajo de graduación presentado por
Luis Enrique Cartagena Canel
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Tecnología
Agrícola y Pecuaria

Guatemala

2017

Evaluación y producción de cepas nativas del hongo
Metarhizium anisopliae, para el control de la chinche salivosa
(*Aeneolamia sp*) de la caña de azúcar a nivel de laboratorio

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación y producción de cepas nativas del hongo
Metarhizium anisopliae, para el control de la chinche salivosa
(*Aeneolamia sp*) de la caña de azúcar a nivel de laboratorio

Trabajo de graduación presentado por

Luis Enrique Cartagena Canel

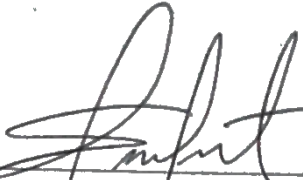
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Tecnología

Agrícola y Pecuaria


Guatemala

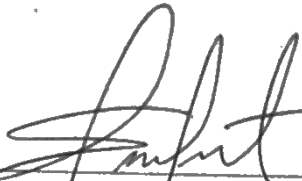
2017

Vo. Bo.:

(f) 
Ing. Agr. Sostenes Eduardo Leal Trujillo
Coordinador de plagas
Ingenio Pantaleón S.A.

(f) 
Ing. Fernando Rafael Rivera Turcios
Director Ingeniería Industrial UVG Sur

(f) 
Ing. Agr. Fernando Hernández Hernández
Área de fertilización y nutrición vegetal
CENGICAÑA

(f) 
Ing. Agr. Sostenes Eduardo Leal Trujillo
Coordinador de plagas
Ingenio Pantaleón S.A.

Fecha de aprobación: Guatemala, 16 de enero 2017.

PREFACIO

El área de plagas y enfermedades de la caña de azúcar del ingenio *Pantaleón S.A.* ha integrado diversas estrategias para reducir las poblaciones de insectos perjudiciales para el cultivo; dentro de los cuales, la chinche salivosa es parte. Por ello dentro de los métodos de control se ha aplicado, por más de 10 años, el hongo entomopatógeno *Metharhizium anisopliae*. Sin embargo, se ha delimitado establecer las cepas más vigorosas para poder producirse factiblemente y que a su vez; contrarresten los efectos de daño causados por el cercópido; pudiendo encontrarse alternativas de control de forma nativa; siendo éstas ya adecuadas a: condiciones de suelo, clima y manejo de cultivo.

A razón de pérdida de patogenicidad registrada durante muestreos de aplicaciones durante años, en campo abierto, ha sido necesario investigar la posible existencia de diversidad entomopatógena de agentes fúngicos; en fines de incrementar el banco de cepas del área de laboratorios biológicos del ingenio, mejorando a su vez los mecanismos de control biológico para plagas en campo; considerando las cepas comerciales ya disponibles para comparar ante las cepas encontradas; integrando metodologías base para futuras investigaciones, contando con historial registrado.

La investigación realizada delimita la dosis letal media y la virulencia de las cepas estudiadas, a su vez, la determinación de producción de toxinas.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
A. Objetivo general	2
B. Objetivos específicos.....	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. Plagas que afectan el follaje en caña de azúcar	4
B. Manejo integrado de la Chinche salivosa (Homóptera: Cercopidae)	4
C. Daños causados	5
D. Ciclo de vida	5
E. Control biológico	6
V. MARCO METODOLÓGICO.....	9
A. 1era. Fase: recolección de muestras de suelo e insectos con síntomas de parasitismo del hongo, para posteriormente realizar aislamientos del mismo.....	9
B. 2da. Fase: realización de aislamientos de las diferentes muestras obtenidas en campo	11
C. 3ra. Fase: comparación de las cepas obtenidas de las diferentes muestras ante las cepas comerciales.....	13
D. 4ta. Fase: almacenamiento de las cepas nativas comprobadas que no son ninguna de las 3 cepas comerciales.....	13
E. 5ta. Fase: caracterización de las cepas nativas y cepas comerciales	14
F. 6ma. Fase: cálculo de costo de producción por dosis de cada cepa nativa y comercial.	19
G. Diseño experimental.....	21
VI. RESULTADOS.....	23
A. Recolección muestras de suelo e insectos con síntomas de parasitismo del hongo, para posteriormente realizar aislamientos del mismo.....	23
B. Realización de aislamientos de las diferentes muestras obtenidas en campo	23
C. Comparación de las cepas obtenidas de las diferentes muestras ante las cepas comerciales	24
D. Caracterización de las cepas nativas y cepas comerciales.....	25
E. Cálculo de costo de producción por dosis, cepas nativas y comerciales	35
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	36

	Página
VIII. CONCLUSIONES.....	37
IX. RECOMENDACIONES	38
X. BIBLIOGRAFÍA.....	39
XI. ANEXOS	42

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Ubicación georeferencial de las fincas para extracción de muestras	9
2. Parámetros de costo de dosis de hongo/cepa	11
3. Cálculo de preparación de sustrato para dosis de hongo	19
4. Cálculo de costos/matriz a producir	19
5. Cálculo de costos para producción de aislamientos	20
6. Resumen de costo de producción/cepa	20
7. Costo de cosecha de hongo en proceso de empaclado	20
8. Costo de mano de obra en el proceso de masificación del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
9. Ubicación de las fincas para recolección de muestras	23
10. Cepas obtenidas según lugar de muestreo	23
11. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa Bisa	24
12. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa PL-43	24
13. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa NB	25
14. Rendimientos de producción de las cepas nativas y comerciales	25
15. Análisis de LSD Fisher de gramos/placa	26
16. Análisis de Fisher de eficiencia de producción	28
17. Análisis de Fisher de concentración/gramo	30
18. Análisis de Fisher de resistencia a UV 60 seg	32
19. Costo de producción/ cepa	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Rendimiento de gramos/placa.....	27
2. Eficiencia de producción de cepas de hongo.....	29
3. Rendimiento de concentración/gramo.....	31
4. Rendimientos de resistencia a UV a 60 segundos.....	33
5. Estimación de la viabilidad a 18 horas de incubación.....	34
6. Estufa agitadora.....	42
7, 8 y 9. Conteo de conidios en cámara de Neubauer, microscopio utilizado y registro empleado.....	42
10. Cámara de flujo laminar.....	43
11. Conteo de conidios.....	43
12 y 13. Cosecha y empaçado	44

RESUMEN

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* producido por el laboratorio de hongos de ingenio *Pantaleón*, con el paso del tiempo; las cepas comerciales que utilizan: PL-43, NB y BISA han ido perdiendo su patogenicidad, para el control de cercópidos plaga del cultivo de la caña de azúcar; según (Márquez, 2001) los daños se estiman en 1.465 kg de az/ha/1 adulto/tallo, lo que conlleva a tener que utilizar productos químicos para el control de esta plaga. (Zafra 2013-2014) se utilizó un aproximado de 6,600 kilos de *Thiamethoxam*, y un aproximado de 50,000 kilos de *Imidacloprid*. Pese a los problemas que presentan las cepas en producción el costo de producirlas es muy elevado ascendiendo a 8 dólares /dosis y esto por la disminución en las características productivas del hongo dentro del laboratorio.

De la investigación realizada se obtuvieron cepas con rendimientos considerablemente aceptables antes sus comparaciones con las cepas comerciales; analizando a cepa Bisa como la mejor productora ante PL-43 y NB de: conidios/gramo, concentración y eficiencia de producción. En contraste de las cepas nativas, fueron cepas de insectos de chinche salivosa adulta procedentes de la finca *Limones* del ingenio y saltón coludo de *Madre Tierra* las de resultados óptimos. Las conjeturas analizadas partieron de que las características productivas podían diferir; obteniendo a la cepa PSA1 con rendimientos superiores a razón de todas las demás estudiadas, según cualidades y cantidades; aunque estadísticamente se puede considerar también a PSA 6 y PSA7 como cepas adecuadas para masificación. Siendo de oportunidad para póstumas investigaciones.

I. INTRODUCCIÓN

El combate biológico de plagas en los cultivos agrícolas es crucial para garantizar un sistema agrícola sustentable; en el que a su vez se conserva la vida por el uso de agentes naturales para mitigar las poblaciones de los insectos perjudiciales de las plantaciones.

Es así como, emplear hongos entomopatógenos resulta positivo para mantener poblaciones de plagas bajo el umbral de daño económico. Existe diversidad en el reino fúngico, entre las cuales se encuentra *Metarhizium anisopliae*; que se ha empleado para controlar la chinche salivosa de la caña de azúcar pero, con el paso de los años la vigorosidad del hongo puede disminuir haciendo crucial, el mantenimiento de cepas virulentas y viables de masificación en condiciones controladas; analizando la posible existencia de diferencia entre potenciales productivos de cepas comerciales ante cepas nativas, extraídas de suelo guatemalteco por la adaptabilidad natural existente, y así fortalecer el banco de cepas de ingenio *Pantaleón S.A.*

La metodología implementada fue a través de insectos trampa, insectos de campo y toma de suelo en fincas de cultivo del ingenio de las cuales, se extrajeron hongos y se delimitó hasta obtener *Metarhizium*; que a su vez, se caracterizó para distinguir las cepas y así analizar su producción de: conidio/gramo, eficiencia productiva y resistencia antes luz UV.

Siendo, de todas las cepas analizadas las provenientes de insectos de campo de chinche salivosa y saltón coludo; ambos plaga de la caña de azúcar los más eficientes al rendir: $6.09E+09$ de concentración a 9% de resistencia antes luz ultravioleta como cepa nativa ante $5.93E+09$ de la cepa BISA en concentración con 83% de rendimiento en luz UV.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Evaluar cepas nativas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, para aumentar la eficiencia de producción y parasitismo del insecto plaga *Aeneolamia sp*, ante cepas comerciales a nivel de laboratorio.

B. Objetivos específicos

- Aislar cepas nativas de campo del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.
- Calcular el rendimiento de gramos/placa de cada cepa nativa aislada.
- Evaluar la resistencia a luz ultravioleta (UV) de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* aisladas de campo.
- Medir la eficiencia de producción de cada cepa nativa y cepas comerciales.
- Evaluar rendimiento de concentración/gramo de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* aisladas de campo.
- Determinar el costo de producción de cada una de las cepas nativas y comerciales.

III. JUSTIFICACIÓN

La chinche salivosa actualmente es uno de los problemas más serios en la industria cañera, (Márquez, 2001), por cada adulto por tallo se pierde 5.82 kg de azúcar/ton métrica, en una edad crítica de 6 a 8 meses, lo que conlleva a pérdidas económicas al no controlar esta plaga. Actualmente el Ingenio *Pantaleón S.A.* maneja 52000 hectáreas, las cuales están destinadas para la producción de caña de azúcar, sin embargo el manejo de chinche salivosa se da en alrededor de 35000 hectáreas, esto representa un 67.3% del área total bajo manejo.

Una de las principales herramientas para el control de esta plaga es la utilización del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, el cual ha sido usado por más de 20 años para el control de la misma.

En el laboratorio de hongos de Ingenio *Pantaleón* se produce este hongo para controlar las poblaciones de la chinche salivosa en campo, y con ello reducir los daños ya mencionados para el grupo productor, pero con el paso del tiempo las cepas comerciales que se utilizan han ido perdiendo su patogenicidad en campo; además de su capacidad productiva dentro del laboratorio, aumentando así el costo de producción por dosis en cada ciclo; cabe mencionar que los parámetros para dicho hongo están fijados en concentración/gramo: 5E9, viabilidad: 97%, eficiencia de producción: 90%, costo de producción/dosis: 3.83 dólares, entre otros, obteniéndose en promedio en la última producción, 2014-2015, concentración/gramo: 3.82E9, viabilidad: 96%, eficiencia de producción: 75%, costo de producción/dosis: 8 dólares, los cuales son valores alarmantes para el grupo productor, ya que se invierte mucho en su masificación y no se obtienen los resultados de rendimiento paralelos a los esperados.

Por todos estos aspectos surge la necesidad de realizar esta investigación, con el propósito de aislar y caracterizar cepas nativas del hongo que superen los parámetros establecidos en producción, a su vez que logren reducir los daños ocasionados por el insecto plaga, chinche salivosa, también este proyecto ha de enriquecer el banco de cepas del laboratorio de hongos de Ingenio *Pantaleón*, y tendrán una base sólida para futuras investigaciones relacionadas al tema debido a que cada proceso establece una metodología clara, que puede ser replicada. Se analizará la pérdida de parasitismo que han tenido las cepas comerciales, aumentando el control de la plaga de chinche a través del uso de cepas más resistentes, adaptadas al ambiente y agresivas en cuanto al parasitismo que presenten. Con esto se ha de lograr una rotación de especies y controlar la dinámica poblacional de la plaga.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Plagas que afectan el follaje en caña de azúcar

Entre algunas de las principales plagas de la caña de azúcar en Guatemala se encuentran las siguientes:

- Gusano taladrador (*Diatraea saccharalis*)
- Gusano medidor (*Mocis latipes*)
- Picudo del pseudotallo, picudo rayado (*Metamasius hemipterus*)
- Taladrador menor de la caña de azúcar (*Elasmopalpus lignosellus*)
- El salivazo de la caña de azúcar (*Aeneolamina sp.*)

(Infoagro, s.f.)

B. Manejo integrado de la Chinche salivosa (Homóptera: Cercopidae)

Esta plaga, se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y se conoce con varios nombres de acuerdo al lugar o país "salivazo" o "mión" en Colombia, "candelilla" en Venezuela; "mosca pinta" en México y "cigarrinha" en Brasil, el salivazo o mosca pinta (*Aeneolamia sp.*) La característica principal de esta plaga es la gran cantidad de espuma similar a la saliva, de ahí su nombre de salivazo. Esta espuma, es lo que protege al insecto en su etapa de ninfa, y está constituida por residuos de jugos nutritivos de la planta y exudaciones del insecto. (biobaro.com, s.f.)

En América Central se encuentran los géneros de *Aeneolamia* y *Prosapia*. Esta plaga puede llegar a provocar reducciones significativas de hasta el 60% en los rendimientos. Según (Márquez, 2001) el factor de pérdida por esta plaga es de 8.21 TCH/ 1 adu/tallo, 5.82 kg de azúcar/ton métrica y un índice de daño de 1465 kg az/ha/1 adu/tallo.

Los adultos son de hábitos crepusculares nocturnos y durante el día se encuentran escondidos en el cogollo y vainas de las hojas de la caña de azúcar, la duración del ciclo varía de los 40 a los 50 días según la especie.

Aeneolamia postica y *Prosapia simulans* son las especies de importancia en el cultivo de caña de azúcar, con el 96 y 4 por ciento de abundancia, respectivamente (Márquez, 2001).

C. Daños causados

El mayor daño lo ocasionan los adultos a las plantas; tienen un aparato bucal picador chupador que introduce en la hoja, localiza una vena y al momento de succionar los alimentos inyecta su saliva la cual es tóxica, interfiriendo con la actividad fotosintética. La saliva del adulto es lo que gradualmente ocasiona la muerte de las hojas. Las ninfas, se alojan en la base del cuello de la raíz, alimentándose de la savia que extraen de las raíces superficiales y cubriéndose de espuma en forma de saliva.

D. Ciclo de vida

El apareamiento de los insectos (macho y hembra), ocurre de 48 a 72 horas después de emergido el adulto, y las hembras se aparean solamente una vez en su vida.

El número de huevecillos que oviposita cada hembra, varía de 39 hasta un máximo de 150. La incubación de los huevecillos que son puestos en los meses del verano, requiere generalmente de 10 a 15 días.

En las condiciones de temperatura y humedad predominantes durante los meses del verano en los cañaverales (30° a 37°C y más de 70% de humedad relativa), el estado de la ninfa o salivazo tarda de 19 a 27 días.

Los insectos adultos viven de 1 a 2 semanas, tiempo en que tiene lugar el apareamiento y se alimentan del jugo de las hojas de la planta, se estima un periodo de 6 a 7 semanas para el ciclo completo (huevecillo, ninfa y adulto) de los insectos de la Segunda y tercera generaciones, bajo las condiciones de lluvia y humedad prevalecientes en la cuenca del Papaloapan, durante los meses de julio a septiembre (Zeno, 2006)

1. **HUEVOS.** En huevos de *P. simulans* se observan cuatro fases de desarrollo (S1, S2, S3 y S4) y son distinguibles por su tamaño y apariencia externa.

Los huevos de salivazo recién ovipositados presentan una coloración amarillo cremoso, no distinguiéndose ninguna estructura en especial, son alargados con una longitud promedio de 1 mm y 0.3 mm de diámetro, con superficie lisa. El tamaño de los huevos, tanto el ancho como el largo, se incrementan significativamente al pasar de una fase a otra y la duración promedio del estado de huevo es de 18 días. La humedad relativa influye notablemente en la duración del periodo de incubación; en condiciones de humedad del 80 ó 90% y temperatura de 26 °C los huevos incuban en un periodo de 15 días, con un rango de 12 a 18 días; en condiciones de baja humedad relativa el periodo de incubación puede prolongarse a 20 ó 30 días, y en ocasiones se inhibe la incubación y los huevos entran en diapausa, que puede durar varios meses, hasta que las condiciones sean favorables. (Zeno, 2006)

2. **Ninfa.** Las ninfas recién eclosionadas están desprovistas de zonas quitinizadas, son sumamente activas e inmediatamente buscan refugio en las partes húmedas y sombreadas de la base de las plantas e inician su alimentación, situándose generalmente en las raíces secundarias o tallos de la planta hospedera, generalmente la posición de alimentación es con la cabeza hacia abajo. Se caracterizan principalmente por la masa de espuma o “saliva” que producen que sirve de defensa de enemigos naturales y como protección de condiciones climáticas adversas. La producción de espuma la llevan a cabo una vez que inician su alimentación, en el transcurso de 5 a 15 minutos, ya que en un tiempo mayor y condiciones adversas de temperatura y humedad, les causaría la muerte por desecación (Bodegas Varela, 1973).

La espuma es formada por una sustancia de consistencia mucilaginosa que es secretada por glándulas hipodérmicas grandes, que están situadas a nivel de la región pleural del séptimo y octavo segmento abdominal y se denominan “glándulas de Batelli”. La sustancia que secretan está compuesta en su mayor parte de un aminoazúcar y por el exceso de líquido que extraen de la planta (CIAT 1982).

En aproximadamente 10% de las espumas cohabitan ninfas que varía de 2 a 5 ocupantes y el diámetro de la espuma es de 3.5 centímetros (Zeno, 2006).

3. **Adulto.** El adulto presenta inicialmente un color blanco y permanece inmóvil durante varias horas dentro de la masa espumosa. Al contacto con el aire, el cuerpo y las alas van adquiriendo lentamente su coloración normal por oxidación de sus pigmentos (CIAT, 1982).

El macho de *Aeneolamia sp.* mide de 7 a 8 mm de largo y la hembra es ligeramente más grande, sus dimensiones son de 8 a 9 mm de largo y de 5 a 6 mm de ancho. El cuerpo tiene una forma oval, la cabeza es de color oscuro o negro brillante, tiene ojos simples (ocelos) muy cercanos uno del otro, aparte de los ojos compuestos que se encuentran desarrollados. Las antenas están formadas por tres segmentos, el último es muy corto y está provisto de dos cerdas. Las alas anteriores (superiores o primer par de alas) son más gruesas que las inferiores, tienen color café oscuro y en algunas especies las atraviesan dos bandas transversales de color amarillo claro, las alas inferiores son de consistencia membranosa. Las patas son de color oscuro, el abdomen está formado por nueve segmentos visibles, los dos primeros se encuentran reducidos. El tiempo promedio de vida del adulto es variable dependiendo de la especie; para *Prosapia simulans* el promedio es de 16.5 días y la duración por sexo es de 15.3 días para machos y 17.9 días para las hembras. (Zeno, 2006)

E. Control biológico

Una de las razones más importantes para restaurar y/o mantener la biodiversidad en la agricultura, es que presta una gran variedad de servicios ecológicos. Uno de estos servicios es la regulación de la abundancia de organismos indeseables a través de la depredación, el parasitismo y la competencia. (Menezes, 1983).

En este sentido, la aplicación del control biológico por medio de entomopatógenos puede ser considerada como una estrategia válida para restaurar la biodiversidad funcional en ecosistemas agrícolas (Zeno, 2006).

1. Uso de hongos entomopatógenos en el control biológico. Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos. Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Pucheta Díaz et al. 2006).

Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control microbiano de insectos plaga, virtualmente todos los órdenes son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, y alrededor de 100 géneros (Leger et alii, 1988).

a. Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*. En general, los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso se inicia cuando la espora o conidia 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 (Vicentini y Magalhaes, 1996).

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. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. (Zeno, 2006)

Recientes estudios con *Metarhizium anisopliae* demostraron claramente que la proteasa es el factor clave en la penetración a la cutícula del insecto por el hongo (St. Leger et alii, 1988).

La cutícula está formada en un 70% aproximadamente de proteínas, lo que explica que sean las proteasas más importantes que las quitinasas. (Leger et alii, 1988).

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 (Hajek y Leger, 1994).

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003).

Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente. La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula ó por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topográficos. También puede fracasar la invasión del hongo por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula (Hajek y Leger, 1994).

Los insectos enfermos presentan cambios de conducta, entre ellos cese de la alimentación, pérdida de coordinación, movilización a partes altas de la planta en que se encuentran o movilización hacia la superficie del suelo en caso de insectos del suelo y síntomas como cambio de coloración del tegumento o manchas en la piel. Después de morir, permanecen como cadáveres presentando los signos característicos como son crecimiento del hongo en las zonas intersegmentales del insecto y una coloración verde por efecto de las esporulaciones. (Lecuona, 1996).

V. MARCO METODOLÓGICO

A. 1era. Fase. Recolección de muestras de suelo e insectos con síntomas de parasitismo del hongo, para posteriormente realizar aislamientos del mismo.

1. Ubicación de la evaluación

a. Fase de incubación. La evaluación en fase de incubación de los hongos obtenidos, bajo condiciones de laboratorio, se llevó a cabo en la sala de transferencia del área de fitopatología del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICANÑA), ubicado en las coordenadas 14°19'48" latitud norte y 91°03'16" longitud oeste.

b. Fase de campo. La colecta de muestras de suelo e insectos con síntomas de parasitismo en campo se realizó en fincas ubicadas en los cuatro estratos altitudinales: alto, medio, bajo y litoral. Los insectos colectados fueron: adultos de chinche salivosa *Aeneolamia sp.*, *Prosapia sp.* y adultos de saltón coludo (*Saccharosydne sp.*). Las fincas seleccionadas para la búsqueda de los insectos, fueron las mismas de donde se tomaron las muestras de suelo.

Tabla 1. Ubicación georeferencial de las fincas para extracción de muestras

Nombre de la finca	Coordenadas
El Bálsamo	91° 16' 92" W 14° 14' 25.486" N
Pantaleón	90° 59' 24.33" W 14° 18' 50.24" N
San José Miramar	90° 57' 21.71" W 14° 16' 55.13" N
San Bonifacio	91° 2' 34.71" W 14° 15' 52.57" N
<i>Limonas</i>	91° 4' 20.01" W 14° 9' 14.17" N
El Baúl	91° 1' 42.95" W 14° 22' 11.84" N
UVG Campus Sur	91°03'16" W 14°19'48" N
CENGICANÑA	91°03'16" W 14°19'48" N

Fuente: autor

La recolección de muestras de suelo se efectuó entre surcos de caña de azúcar en crecimiento durante las primeras horas luz del día, según el procedimiento siguiente:

1) Extracción de muestras de suelo

- Identificar el punto de muestreo.
- Delimitar el lote a muestrear a 10 metros cuadrados.
- Dentro de los 10 metros cuadrados seleccionar 3 puntos al azar.
- Eliminar el rastrojo superficial y piedras.
- Extraer la muestra equivalente a 2 kg de los primeros 15 centímetros de suelo, (esto se hará en cada uno de los tres puntos seleccionados) y colocarlos en una bolsa o recipiente identificado con los datos correspondientes.
- Llevar al laboratorio para realizar aislamientos.

2) Colecta de insectos con síntomas de parasitismo. Se realizó en el mismo intervalo de tiempo que las muestras de suelo, según los lineamientos

- Contar con recipientes adecuados para el almacenamiento (vial).
- Observar entre la parte basal de las hojas de los entrenudos de la caña de azúcar.
- Si hay presencia de adultos de chinche salivosa, solamente se tomaran insectos con síntomas de parasitismo (presencia de micelio, insectos momificados y con poca movilidad), evitando seleccionar aquellos que estén depredados y acuosos.
- Colocar un individuo por vial.
- Identificar cada insecto con la fecha de colecta y el lugar.
- Trasladar al laboratorio.
- Proceder a colocar en cámaras húmedas.

3) Preparación de cámaras húmedas

- Cortar papel servilleta o toalla a la medida de la placa Petri que se desea utilizar.
- Colocar el papel dentro de la placa Petri.
- Colocar dentro de la placa Petri dos porta objetos en forma de cruz (esto es para colocar los insectos).
- Colocar una bolita de 1 cm de algodón dentro de la placa (esta servirá para humedecerla y mantener la humedad dentro del cámara).
- Esterilizarlas por 10 minutos a 121°C.
- Colocar los insectos recolectados dentro de las cámaras húmedas (5 por cámara).
- Incubarlas a 26 – 28°C.
- Humedecer el algodón cada día por 12 días (este lapso de tiempo es suficiente para observar la esporulación del hongo sobre el cuerpo del insecto)
- Aislar las esporas del hongo que crezcan sobre la superficie del cuerpo del insecto.

B. 2da. Fase realización de aislamientos de las diferentes muestras obtenidas en campo

1. Preparación de las muestras de suelo para su inoculación en el medio selectivo

La metodología implementada fue:

- Pesar 10 gramos de suelo. (Por cada muestra)
- En un Erlenmeyer medir 100 mililitros de agua esterilizada.
- Agregar los 10 gramos de suelo al Erlenmeyer con el agua estéril.
- Agitar en un agitador a 160 rpm (revoluciones por minuto), por tres horas.
- Tomar 1 mililitro de cada muestra y colocarla en las placas con medio de cultivo.
- Agitar con varilla doblada.
- Incubar a 26 – 28 °C por 8 días.
- Aislar las cepas que se desarrollen, en un nuevo medio de cultivo.

2. Preparación del medio de cultivo

- Pesar 20 gramos de dextrosa.
- Pesar 18 gramos de agar-agar.
- Pesar 10 gramos de peptona de caseína.
- Medir 500 ml de agua desmineralizada en un Erlenmeyer.
- Mezclar la dextrosa, peptona de caseína y agar-agar en los 500 ml de agua desmineralizada.
- Esterilizar por 10 minutos a 121 °C.
- Dejar que enfrie (como máximo debe estar a 36 °C)
- Agregar 250 mg de tetraciclina.
- Agregar 250 mg de Gentamicina
- Agregar 250 mg de Cloranfenicol.
- Agregar 1 gota de mertect 50 sc (con una pipeta de Pasteur).
- Agitar el medio (con la mano).
- Verter en las placas previamente esterilizadas a 121°C, por 10 minutos (llenar media placa con el medio).
 - Dejar que solidifique.
 - Tapar las placas para posteriormente usarlas.

Durante el tiempo de incubación se revisaron las placas diariamente para observar el desarrollo fúngico sobre el medio de cultivo, descartando aquellas placas que presentaban cualquier otro hongo distinto al evaluado (*Trichoderma sp*, *Penicillium sp*, *Paecilomyces sp*, *Aspergillus sp*).

Póstumo a los 12 días de incubación de los insectos, se multiplico el hongo desarrollado en aislamientos de medio de haba.

3. Preparación medio de haba

- Cocer 75 g de Habas secas en 500 ml de agua desmineralizada,
- Añadir 10 g de Dextrosa y 15 g de agar.
- Aforar a un litro con agua desmineralizada en una licuadora.
- Licuar por 3 minutos.
- Verter en un Erlenmeyer de 1000 ml (500 ml en uno y 500 ml en otro).
- Esterilizar a una presión de 18 lb/in² y una temperatura de 120°C.
- Cuando tenga una temperatura de 60°C, añadir 500 mg de Cloranfenicol o 500 mg de Gentamicina.

Con la ayuda de agujas de disección estériles, se procedió a tomar esporas del hongo, para ello se tocó el insecto con la punta de la aguja y luego se dispusieron tres puntos en forma triangular sobre la placa, conteniendo el medio de cultivo de haba.

Se incubaron las placas con el hongo aislado a una temperatura de 26 – 28 °C, y un tiempo de 12 días. Dicho material fue colocado de cabeza sobre una mesa y se observó todos los días para analizar su desarrollo y descartar placas con presencia de otros hongos.

4. Técnica de insectos trampa para extracción del hongo. Los insectos trampa escogidos fueron *Gallerias mellonela*, reproducidos de forma masiva en los laboratorios de *Pantaleón*, considerando que este insecto es altamente susceptible a hongos entomopatógenos, inhibiendo el desarrollo de cualquier otro hongo que no cumpla con esta característica.

a. Técnica de insectos trampa

- Colocar 10 *Gallerias* en un recipiente plástico con tapa.
- Agregar 800 gramos de suelo sobre ellas.
- Darle vuelta al recipiente a cada 24 horas (en este tiempo las *Gallerias* deberían atravesar toda la muestra de suelo y llegar a la superficie).
- Dejarlas hasta los 10 días.
- Recolectar las larvas del recipiente o pupas.
- Colocar las larvas en cámaras húmedas sin ser previamente lavadas.
- Si ya son pupas eliminar el capullo y colocar en cámaras húmedas.
- Incubarlo a 26 – 28°C por 12 días.
- Realizar la siembra de los insectos parasitados en medio de haba.

C. 3ra. Fase: Comparación de las cepas obtenidas de las diferentes muestras ante las cepas comerciales

En placas con medio de cultivo de haba se aislaron las cepas comerciales provenientes del silica gel, también se multiplicaron las cepas nativas de insectos para su posterior comparación.

1. Comparación de cepas

- Contar con placas contiendo medio de cultivo de haba.
- Poseer aislamientos de todas las cepas a comparar.
- Hacer una línea divisoria con un marcador en la parte de atrás de la placa identificando cada cepa.
 - Con una aguja de disección estéril, tocar una vez las esporas de la cepa comercial y colocarla sobre el lado identificado de la placa seleccionada.
 - Con otra aguja de disección estéril, tocar la otra cepa que se desea comparar y colocar sobre su respectiva identificación sobre el medio de cultivo.
 - Colocar de cabeza las placas sobre una mesa con luz continua y una temperatura de 26 - °C28.
 - Observar el desarrollo de las colonias.
 - Técnicamente si las dos colonias se unen es la misma cepa, si se forma una línea divisoria entre ambas colonias es una cepa distinta.

D. 4ta. Fase: Almacenamiento de las cepas nativas comprobadas que no son ninguna de las 3 cepas comerciales

Se realizó la técnica de silica gel para almacenar las cepas nativas encontradas

- Pesar 4 gr de silica gel en un vial.
- Hornear por 2 horas a 170 °C.
- Esterilizar una mezcla de leche menor al 4% de grasa (10gramos de leche en 100 ml de agua desmineralizada y esterilizada) en autoclave a 121 °C por 10 minutos.
 - Dejar enfriar.
 - Verter 20 ml de la mezcla de leche en un beaker de 250 ml.
 - De una placa llena de esporas del hongo raspar la mitad de la placa con una varilla doblada.
 - Aplicar las esporas en la solución de leche en el beaker.
 - Agitar la mezcla con una varilla doblada
 - Tomar 1 ml de dicha mezcla con una pipeta serológica de 1 ml y aplicarlo al vial conteniendo el silica gel.

- Agitar el vial fuertemente con la mano tratando de despegar las perlas de silica gel.
- Colocar el vial en un recipiente con hielo por 1 minuto.
- Agitar nuevamente y volver a colocar en el recipiente con hielo.
- Por tercera y última vez agitar el vial y sellar con parafilm.
- Almacenar los viales a una temperatura de 4°C.

Con esta técnica las cepas podrán permanecer aproximadamente por 4 años viables, para su posterior uso.

E. 5ta. Fase: Caracterización de las cepas nativas y cepas comerciales

1. **Elaboración de R1 (Réplica 1).** Dentro de una cámara de flujo laminar y con la auxilio de una pinza estéril se procedió a extraer tres perlas de silica gel de cada vial conteniendo las cepas, se colocó en una placa con medio de cultivo de haba, identificada con la cepa y fecha de siembra, se incubó a 26 - 28°C por 12 días; las placas fueron colocadas en una mesa boca abajo con luz continua. Los R1 elaborados fueron de todas las cepas, tanto nativas como comerciales.

2. **Elaboración de R2 (Réplica 2).** Póstumo a los 12 días de incubación de los R1, se procedió a realizar los R2, que consistió en utilizar una aguja de disección estéril para extraer las esporas del hongo de cada cepa, tocando una colonia de hongo con la punta de la aguja, se llevó hacia el medio de cultivo de haba colocándola en el centro de la placa en dos puntos diferentes, posterior a esto se difuminó toda la superficie del medio con una varilla doblada estéril, esto con la finalidad de expandir las esporas del hongo sobre la parte superficial del medio de cultivo, favoreciendo a su esporulación. Todo este procedimiento se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar. Las placas sembradas fueron colocadas sobre una mesa boca abajo, luz continua e incubadas a 26 – 28°C por 12 días, se revisaron las placas todos los días a partir del día 4 de incubación, para observar posibles contaminantes.

3. **Efecto de la luz ultravioleta sobre la germinación de las cepas nativas y comerciales.** Para ello se preparó medio de cultivo de Agar-Agar, inoculado con una suspensión de cada cepa a 0.5 gramos en 100 ml de agua estéril, se esparció con una varilla doblada y luego a la luz germicida de 254 nanómetros de longitud de onda, esta prueba se realizó en un tiempo de 0 a 360 segundos. Con intervalos de 60 segundos, posteriormente se incubaron todas las placas por 16 horas para realizar el conteo de conidios germinados y no germinados.

4. **Medición de rendimiento de gramos/placa.** Con todas las R2 obtenidas de las cepas nativas y comerciales, dentro de una cámara de flujo laminar, se procedió a raspar el hongo contenido en el medio de haba, esto se efectuó con un raspador de conidio pesando el hongo raspado en una balanza semi analítica.

5. Inoculación de sustrato y desarrollo de cepas nativas y comerciales. Preparación de sustrato (arroz precocido)

- Pesar 170 gramos de arroz precocido en una bolsa de poli propileno.
- Agregar 150 ml de agua desmineralizada estéril a la bolsa con el arroz.
- Engrapado las bolsas (4 grapas por bolsa).
- Esterilizar a 131 °C las bolsas.
- Eliminar los grumos que se generan en el arroz.
- Dejar enfriar hasta los 36°C como máximo para inocular.

a. Matrices líquidas 72 horas de agitación e inoculación de las mismas

- Pesar 22 gramos de dextrosa, 2.5 gramos de peptona de caseína y 10 gramos de extracto de levadura.
- En un beaker de 1000 ml medir 800 ml de agua desmineralizada y autoclaveada.
- Aplicar la dextrosa, peptona de caseína y extracto de levadura en los 800 ml de agua autoclaveada.
- Mover hasta diluir la mezcla con una varilla doblada estéril.
- Colocar la mezcla en un erlenmeyer de 1000 ml.
- Tapar con papel aluminio el erlenmeyer.
- Esterilizar la matriz por 1 hora a 131 °C.
- Dejar enfriar dentro de una cámara de flujo laminar o en sala libre de contaminación.
- Raspar 2 placas R2 de la cepa deseada y pesar 1.2 gramos.
- Inocular la matriz ya fría o a 36°C con la cantidad pesada de hongo.
- Colocar en un agitador a 162 rpm por 72 horas.

6. Inoculación de sustrato. Con las bolsas ya preparadas y enfriadas fue necesario proseguir con lo siguiente:

Se seleccionaron las matrices ya inoculadas y agitadas, por medio de control de calidad visual en un microscopio se muestrearon todas las matrices con las diferentes cepas, con una pipeta de Pasteur y un bulbo se extrajo un poco del contenido y se colocó una gota en un porta objetos y cubre objetos para su examinación, para detectar posibles contaminantes en las matrices y descartarlas. Una vez revisadas fueron separadas por cepa y se inocularon en el sustrato.

Dentro de una cámara de flujo laminar con la ayuda de una jeringa inoculadora se midieron 18cc de matriz y se aplicó a las bolsas de sustrato estéril, se agitaron las bolsas para homogenizar y fueron llevadas a la sala de transferencia donde fueron incubadas a una temperatura de 26 – 28°C, humedad relativa de 80 – 90% y un fotoperiodo de 48 horas oscuridad y luz continua, por 14 días. En este lapso

de tiempo a cada 4 días se removió el sustrato para oxigenar el inóculo y que a su vez el inóculo se desarrolle favorablemente; estimulando la esporulación a los 4 y 8 días y eliminar bolsas contaminadas por otros hongos, bacterias u otros contaminantes; como levaduras.

El sustrato que se utilizó para la prueba fue arroz precocido y esterilizado, utilizado además para la preparación de las matrices líquidas de 72 hrs de agitación (blastosphoro) según metodología empleada en el laboratorio, a cada matriz se le inoculaba una cantidad de 1.2 gramos de conidio fresco, se utilizaron 18cc de inóculo para cada bolsa de sustrato conteniendo 350gr y se llevó a desarrollo para que cumpliera su ciclo, a 26°C – 28°C de temperatura con humedad relativa de 70%-80% y un fotoperiodo de 48 horas oscuridad y luego luz continua, hasta cumplir su ciclo de incubación el cual constó de aproximadamente 12 – 14 días, esto dependió del desarrollo de cada cepa.

7. Medición de la eficiencia de producción de todas las cepas. Al cumplirse los 14 días de incubación de las bolsas, se procedió a realizar su cosecha y se contabilizó las bolsas totales por cepa.

a. Estimación de eficiencia de producción. Fórmula 1.

$$\text{Eficiencia de producción} = \frac{\text{Bolsas cosechadas}}{\text{Bolsas totales}} * 100$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

b. Secado del hongo. Posterior a ser cosechadas todas las bolsas de sustrato, conteniendo el hongo de cada cepa inoculada, fueron trasladadas a otra sala donde se procedió a romperlas con una tijera y se colocaron 4 bolsas por bandeja, esto se realizó por cada cepa. Esta sala permaneció a una temperatura de 26 – 28 °C y un deshumificador, hasta que el hongo tuvo un 17% de humedad para poder ser almacenado en frío.

c. Cálculo de humedad del hongo

- Pesar 1 gramo de sustrato
- Anotar el peso inicial.
- Colocar la muestra por 30 segundos en un horno.
- Anotar el peso.
- Colocar la muestra nuevamente por 30 segundos en el horno.
- Anotar el peso nuevamente.
- Realizar este procedimiento hasta que el peso final se vuelva constante.
- Calcular la humedad en base a la fórmula 2.

$$\text{Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

d. Medición del rendimiento de conidios/gramo. Con el sustrato de cada cepa al 17% de humedad se procedió a tomar muestras individuales de cada cepa, para que con ayuda del área de conformidad del laboratorio de *Pantaleón S.A.* se determinara su rendimiento de conidios/gramo.

1) Procedimiento:

- Sacar una muestra homogénea del lote (10%) del total de bandejas.
- Colocar la muestra en una bolsa de polipropileno.
- Homogenizar la muestra.
- Pesar 10 gramos de muestra de hongo.
- Medir 100 ml de agua desmineralizada con una probeta.
- Colocar en un beaker de 250 ml los 10 gramos de muestra de hongo.
- Agregarle los 100 ml de agua desmineralizada.
- Colocarle un magneto a la solución.
- Agitar por 10 minutos.
- En 3 tubos de ensayo colocar en dos de ellos 9 ml y en el otro 2 ml (según lo concentrado de la muestra, puede ser 1 ml).
- De la muestra agitada por 10 minutos tomar 1 ml y colocarlo en uno de los tubos conteniendo 9 ml.
- Agitarlo en un vortex por 3 minutos.
- De esta dilución tomar 1 ml y colocarlo en el otro tubo conteniendo 9 ml.
- Agitar por 3 minutos en un vortex.
- De esta dilución tomar 1 ml y colocarlo en el tubo que contiene 2 ml.
- Agitar por 3 minutos en el vortex.
- De esta última dilución hacer la lectura de conidios.
- Tomar con una pipeta de Pasteur una muestra de la solución y llenar la cámara de Neubauer.
- Esperar un minuto para que se estabilice la muestra.
- Leer en el microscopio en el lente 10 x.
- Hacer conteo de los conidios en todos los campos.
- Realizar la sumatoria de los 8 cuadrantes.
- Calcular la media de los 8 cuadrantes.
- Calcular el coeficiente de variación.
- Calcular la desviación estándar.
- Calcular los conidios en base a fórmula 3.

$$\text{Conidios/gramo} = \frac{\text{Media} * 10^4 * 10^3 * 100}{10}$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

e. Viabilidad de las cepas. A su vez también se tomó un gramo de muestra/cepa, para poder medir su viabilidad a las 18 horas de incubación. El conteo se efectuó en placas de medio de cultivo agar-agar.

1) Preparación de placas con medio de cultivo agar- agar

- Pesar 13 gramos de agar-agar
- Diluir en 1 litro de agua desmineralizada.
- Esterilizar por 10 minutos a 121°C.
- Verter el medio en placas de contacto estéril(o placas Petri de vidrio).
- Dejar que solidifique.
- Sellar con parafilm las placas y almacenar a 4°C.

2) Metodología de montaje de viabilidad

- Pesar 1 gramos de muestra del hongo.
- Agregar el gramo de muestra del hongo en 5 ml de agua desmineralizada y esterilizada.
- Agitar en el vortex por 1 minuto.
- Tomar una muestra con una pipeta de Pasteur y agregar 3 gotas de la misma en una placa Petri conteniendo Agar-Agar.
- Sellar con parafilm.
- Incubar por 18 horas a una temperatura de 28°C.
- Incubar en oscuridad las 18 horas.
- Hacer el conteo en 5 campos diferentes de conidios vivos y conidios muertos.
- Calcular promedios de los datos obtenidos.
- Calcular mediante las fórmulas 4 y 5:

Fórmula 4

$$\frac{\text{Viabilidad}}{\text{Campo}} = \text{Conidios vivos} + \text{conidios muertos}$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Cada campo debe contabilizarse individualmente, después se calcula la viabilidad total.

Fórmula 5

$$\% \text{ Viabilidad} = \sum \frac{\text{Viabilidad}}{\text{campo}} / \text{total de campos}$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

F. 6ma. Fase: cálculo de costo de producción por dosis de cada cepa nativa y comercial.

El modelo que se utilizara para esta medición es el siguiente:

Tabla 2. Parámetros de costo de dosis de hongo/cepa

Costo de dosis de hongo/cepa		
Base de cálculo	10	qq/día
Obteniendo	1800	bolsas/día
equivalentes a	346	dosis 5E12

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 3. Cálculo de preparación de sustrato para dosis de hongo

Preparación de sustrato 1800 bolsas						
Insumo	Unidad	Precio Q.	Precio \$	Unidades utilizadas	Costo total\$/día	Costo \$/dosis
Arroz	qq	170	21.79	10	217.95	
Bolsa polipropileno	unidad	0.15	0.02	1800	34.62	
Cinta testigo	unidad	60.14	7.71	1	7.71	
Grapas	caja	7.14	0.92	1.44	1.32	
Total					261.59	0.71

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 4. Cálculo de costos/matriz a producir

No. Matrices/día, 44						
Insumo	Unidad	Precio Q.	Precio \$	Unidades utilizadas	Costo total\$/día	Costo \$/dosis
Agua desmineralizada	lts	21	0.27	20	0.24	
Dextrosa	kg	19.19	2.46	22	2.38	
Extracto de levadura	kg	1624	208.21	10	91.61	
Peptona de caseína	kg	1427.25	182.98	2.5	20.13	
Algodón	unidad	78.39	10.05	0.17	1.68	
Gasa	unidad	4.42	0.57	0.03	0.02	
Papel aluminio	rollo	79.46	10.19	0.01	0.08	
Masking 1"	rollo	6.24	0.8	0.0125	0.44	
Total					116.34	0.31

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 5. Cálculo de costos para producción de aislamientos

No. aislamientos/día 88 No. de sobres/día 44						
Insumo	Unidad	Precio Q.	Precio \$	Unidades utilizadas	Costo total\$/día	Costo \$/dosis
Haba	lbs	8.2992	1.12	60	13.03	
Agar-agar	kg	1071.50	137.37	12	145.06	
Dextrosa	kg	2	2.46	10	2.16	
Grapa	unidad	7.14	0.92	2.5		
Papel manila	pliego	0.26	0.033	0.17		
Total					160.25	0.433

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 6. Resumen de costo de producción/cepa

Resumen de costo			
Rubro	Costo\$/día	Costo\$ /5E12	%
Sustrato	261.59	0.707	18.44
Matrices	116.34	0.31	8.20
Aislamiento	160.25	0.433	11.30
Cosecha	0.065	0.065	1.71
Mano de obra	2.44	2.44	60.35
Total	540.56	3.95	100

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 7. Costo de cosecha de hongo en proceso de empacado

Insumo	Unidad	Precio Q.	Precio \$	Unidades utilizadas	Costo total\$/día	Costo \$/dosis
bolsas 25 lbs	bolsa	0.51	0.07	70	24.19	
Total						0.065

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Tabla 8. Costo de mano de obra en el proceso de masificación del hongo *Metarhizium anisopliae*

Mano de obra								
Proceso	No. Personas	Salario./ día	Séptimo	Bono* dosis	Bonificación ley	Salario \$/día	Costo\$/ día	Costo\$/ dosis
Aislamientos	1	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	70.56	0.20
Inoculación	3	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	211.67	0.61
Quiebre	2	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	141.11	0.41
Llenado de bolsas	4	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	282.23	0.82
Control de calidad	1	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	70.56	0.20
Cosecha	1	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	15.30	0.14
Encargado met.	1	82.00	136,66 7	446.34	8.33	70.56	20.43	0.06
Total								2.44

Fuente: *Pantaleón S.A.*

Costo de producción (CProd). Fórmula 6

$$CProd = \frac{\text{Costo}}{\text{dosis } 5E12 \text{ cepa BISA}} * \frac{\frac{\text{Gramos}}{\text{dosis } 5E12 \text{ cepa evaluada}}}{\text{Gramos dosis cepa BISA}}$$

Fuente: *Pantaleón S.A.*

G. Diseño experimental

En cada fase se realizará un experimento en laboratorio con un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Este diseño se recomienda cuando existe homogeneidad entre unidades experimentales, esto quiere decir que no existe influencia de la ubicación de la unidad experimental sobre el efecto del tratamiento, esto es muy utilizado en ensayos a nivel de laboratorio, cuando se utilizan medios de cultivos, donde las condiciones son las mismas para todas las unidades experimentales.

1. Modelo estadístico. Fórmula 7.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, 20, t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, r$$

Siendo:

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

μ = media general de la variable de respuesta

t_i = efecto del i – ésimo tratamiento (nivel de factor) de la variable dependiente

Donde:

Cada cepa fue denotada como un factor independiente. Considerando para cada una:

- Gramos/placa.
- Eficiencia de producción.
- Concentración/gramo.
- Resistencia a luz ultravioleta.

La experimentación se categorizó en:

- Las cepas encontradas: tratamientos.
- Los tratamientos se conformaron de 3 repeticiones.
- Las repeticiones se formaron de 1 unidad experimental hasta la medición de eficiencia de producción; puesto que de cada unidad se distribuyó en 4 subdivisiones, por las bolsas de sustrato a inocular.

2. **Análisis de datos.** Se hizo uso del paquete estadístico InfoStat versión 1.0 empleando la metodología de análisis estadístico de prueba de hipótesis con la razón F de Fisher, LSD Fisher.

VI. RESULTADOS

A. Recolección muestras de suelo e insectos con síntomas de parasitismo del hongo, para posteriormente realizar aislamientos del mismo

Tabla 9. Ubicación de las fincas para recolección de muestras

Nombre de la finca	Total de muestras	Total insectos
El Bálsamo	100	0
Pantaleón	100	0
San José Miramar	100	0
San Bonifacio	50	0
<i>Limonas</i>	50	5
El Baúl	50	0
UVG Campus Sur	10	0
<i>CENGICAÑA</i>	0	2

Fuente: autor.

B. Realización de aislamientos de las diferentes muestras obtenidas en campo

Dentro de las muestras de suelo e insectos recolectados en campo se obtuvieron las cepas siguientes:

Tabla 10. Cepas obtenidas según lugar de muestreo

Cepa	Origen	Procedencia
PSA 1	<i>Limonas</i>	Adulto de chinche salivosa
PSA 2	<i>Limonas</i>	Adulto de chinche salivosa
PSA 3	<i>Limonas</i>	Adulto de chinche salivosa
PSA 4	<i>Limonas</i>	Adulto de chinche salivosa
PSA 5	<i>Limonas</i>	Adulto de chinche salivosa
PSA 6	<i>CENGICAÑA</i>	Adulto de saltón coludo
PSA 7	<i>CENGICAÑA</i>	Adulto de saltón coludo
PSA 8	UVG Sur	Suelo
PSA 9	UVG Sur	Suelo
PSA 10	UVG Sur	Suelo
PSA 11	UVG Sur	Suelo
PSA 12	UVG Sur	Suelo

Fuente: autor

C. Comparación de las cepas obtenidas de las diferentes muestras ante las cepas comerciales

Tabla 11. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa BISA

Comparación de cepas		
Patrón	Comparador	Resultado
Cepa BISA	PSA 1	no unida
Cepa BISA	PSA 2	no unida
Cepa BISA	PSA 3	no unida
Cepa BISA	PSA 4	unida
Cepa BISA	PSA 5	no unida
Cepa BISA	PSA 6	unida
Cepa BISA	PSA 7	no unida
Cepa BISA	PSA 8	no unida
Cepa BISA	PSA 9	no unida
Cepa BISA	PSA 10	no unida
Cepa BISA	PSA 11	no unida
Cepa BISA	PSA 12	no unida

Fuente: autor.

Tabla 12. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa PL-43

Comparación de cepas		
Patrón	Comparador	Resultado
Cepa PL-43	PSA 1	no unida
Cepa PL-43	PSA 2	no unida
Cepa PL-43	PSA 3	no unida
Cepa PL-43	PSA 4	no unida
Cepa PL-43	PSA 5	no unida
Cepa PL-43	PSA 6	no unida
Cepa PL-43	PSA 7	no unida
Cepa PL-43	PSA 8	no unida
Cepa PL-43	PSA 9	no unida
Cepa PL-43	PSA 10	no unida
Cepa PL-43	PSA 11	no unida
Cepa PL-43	PSA 12	no unida

Fuente: autor.

Tabla 13. Resultados de unión de colonias para identificación de cepas, patrón cepa NB

Comparación de cepas		
Cepa NB	Comparador	Resultado
Cepa NB	PSA 1	no unida
Cepa NB	PSA 2	no unida
Cepa NB	PSA 3	no unida
Cepa NB	PSA 4	no unida
Cepa NB	PSA 5	no unida
Cepa NB	PSA 6	no unida
Cepa NB	PSA 7	no unida
Cepa NB	PSA 8	no unida
Cepa NB	PSA 9	no unida
Cepa NB	PSA 10	no unida
Cepa NB	PSA 11	no unida
Cepa NB	PSA 12	no unida

Fuente: autor.

D. Caracterización de las cepas nativas y cepas comerciales

Tabla 14. Rendimientos de producción de las cepas nativas y comerciales

Cepa	Gramos/placa	% Eficiencia de producción	Concentración/ gramo	% de resistencia a UV 30 seg
PSA 1	0,56	100	6,09E+09	9
PSA 2	0,57	75	4,40E+09	9
PSA 3	0,63	58	2,59E+09	6
PSA 4	0,59	83	5,80E+09	5
PSA 5	0,4	58	1,76E+09	4
PSA 6	0,57	83	5,77E+09	11
PSA 7	0,55	83	6,00E+09	10
PSA 8	0,74	67	1,44E+09	0
PSA 9	0,42	0	0	0
PSA 10	0,41	0	0	0
PSA 11	0,35	25	1,03E+09	0
PSA 12	0,36	58	2,51E+09	4
BISA	0,57	83	5,96E+09	12
PL- 43	0,42	17	2,84E+09	8
Nb	0,43	25	3,53E+09	6

Fuente: autor.

Tabla 15. Análisis de LSD Fisher de gramos/placa

Variable N	R ²	R ² Aj	CV
Gr/placa45	0,94	0,91	6,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo		0,55	14	0,04	33,57 <0,0001
Tratamiento		0,55	14	0,04	33,57 <0,0001
Error		0,04	30	1,2E-03	
Total		0,59	44		

Test: LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 0,05706

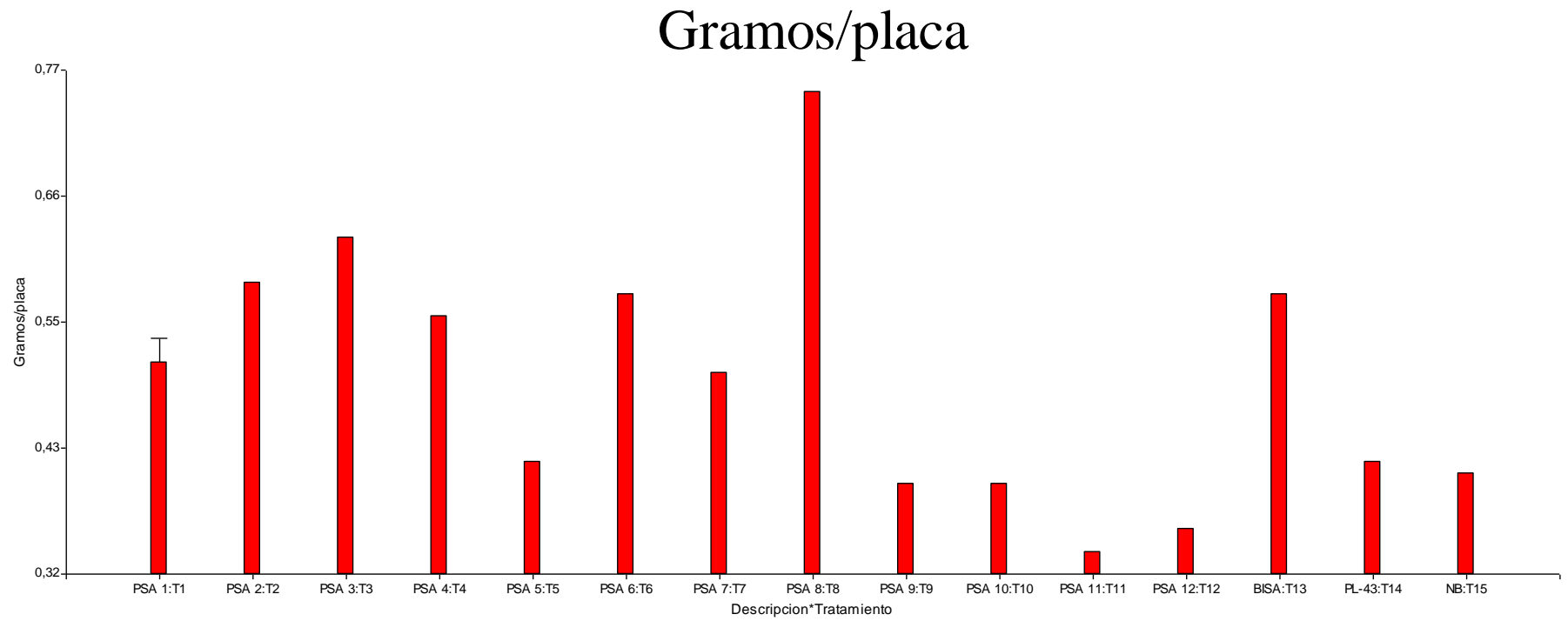
Error: 0,0012 gl: 30

Tratamiento	Medias	n				
T11	0,35	3	A			
T12	0,36	3	A	B		
T5	0,40	3	A	B	C	
T10	0,41	3		B	C	
T14	0,42	3			C	
T9	0,42	3			C	
T15	0,43	3			C	
T7	0,55	3				D
T1	0,56	3				D
T2	0,57	3				D
T13	0,57	3				D
T6	0,57	3				D E
T4	0,59	3				D E
T3	0,63	3				E
T8	0,74	3				F

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

Fuente: autor.

Ilustración 1. Rendimiento de gramos/placa



Fuente: autor.

Tabla 16. Análisis de Fisher de eficiencia de producción

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Eficiencia	45	0,82	0,74	33,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	45361,11	14	3240,08	9,72	<0,0001
Tratamiento	45361,11	14	3240,08	9,72	<0,0001
Error	10000,00	30	333,33		
Total	55361,11	44			

Test: LSD Fisher Alfa: 0,05 DMS: 30,44439

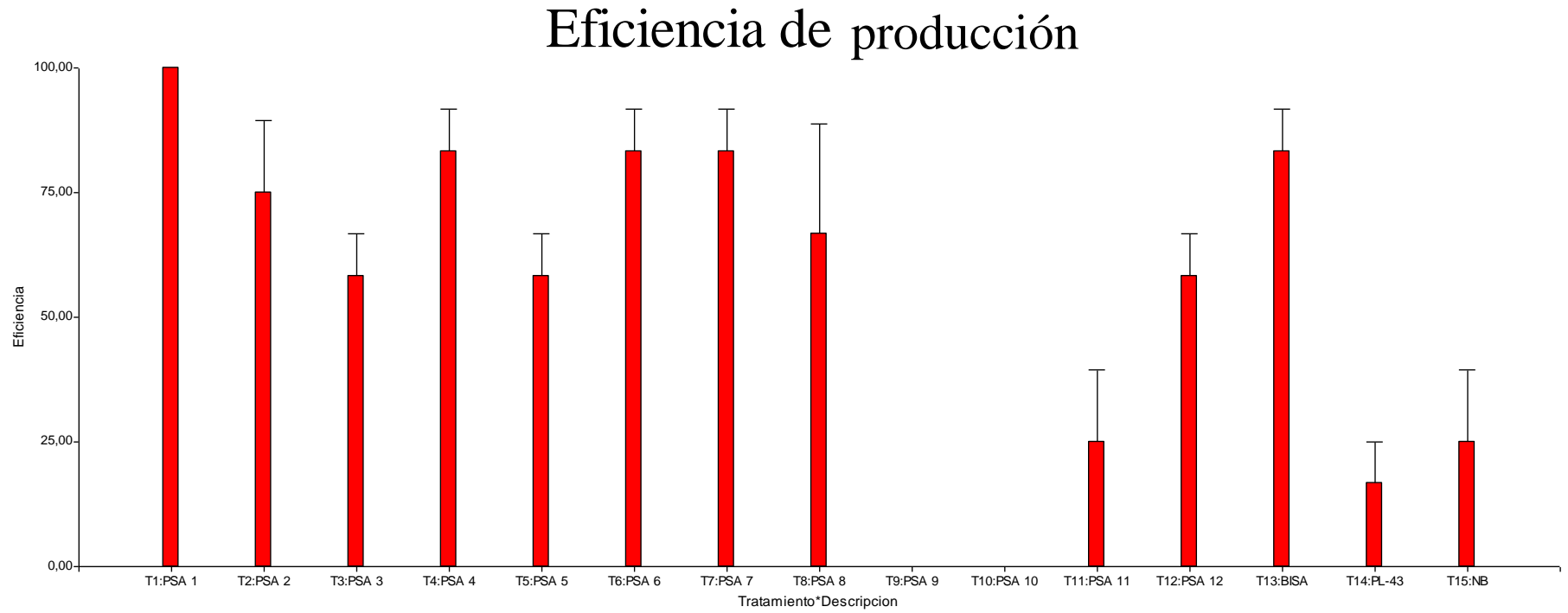
Error: 333,3333 gl: 30

Tratamiento	Medias	n		
T10	-1,4E-14	3	A	
T9	1,4E-14	3	A	
T14	16,67	3	A	
T11	25,00	3	A	
T15	25,00	3	A	
T5	58,33	3		B
T3	58,33	3		B
T12	58,33	3		B
T8	66,67	3		B
T2	75,00	3		B C
T7	83,33	3		B C
T13	83,33	3		B C
T4	83,33	3		B C
T6	83,33	3		B C
T1	100,00	3		C

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

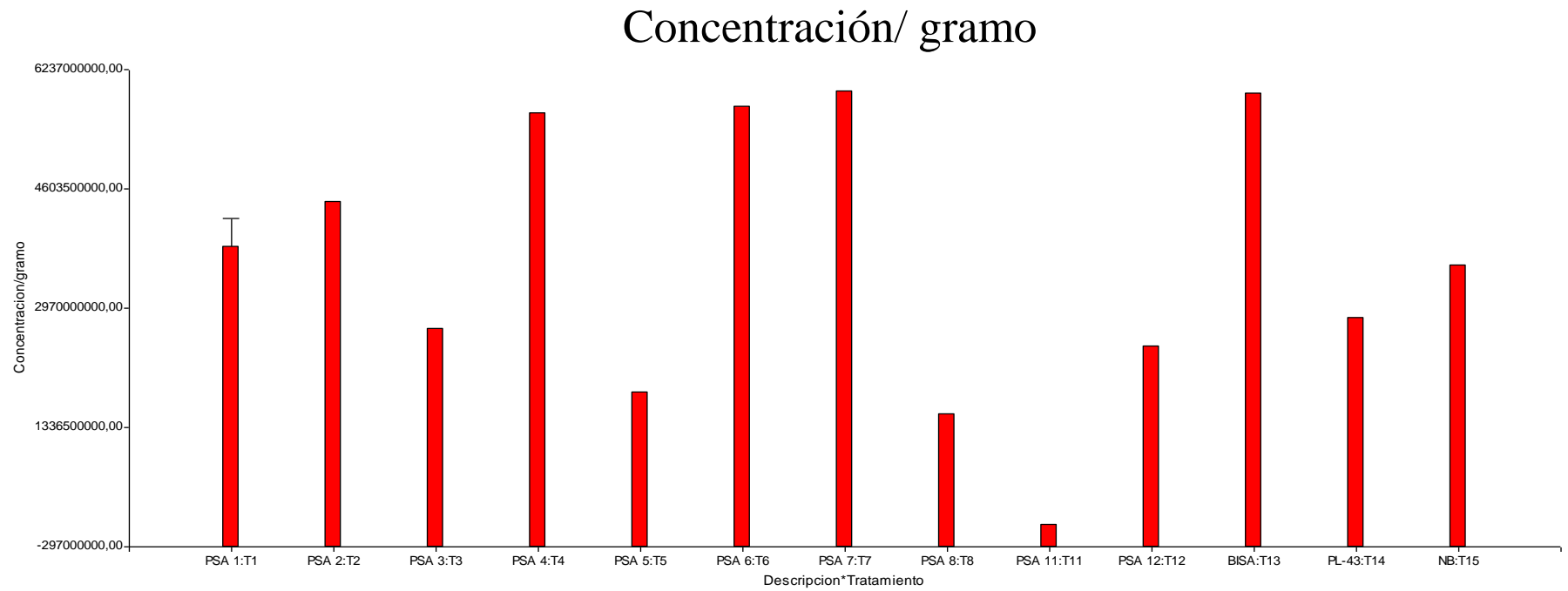
Fuente: autor.

Ilustración 2. Eficiencia de producción de cepas de hongo



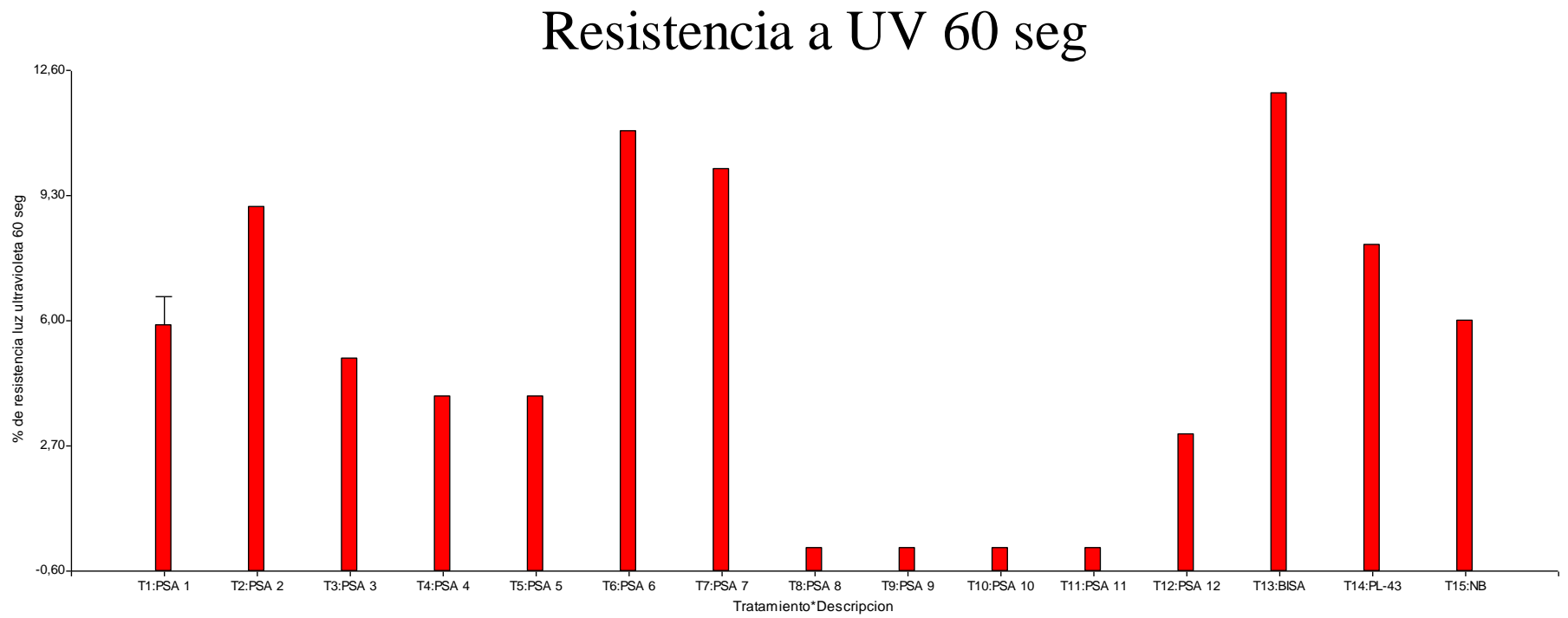
Fuente: autor.

Ilustración 3. Rendimiento de concentración/gramo



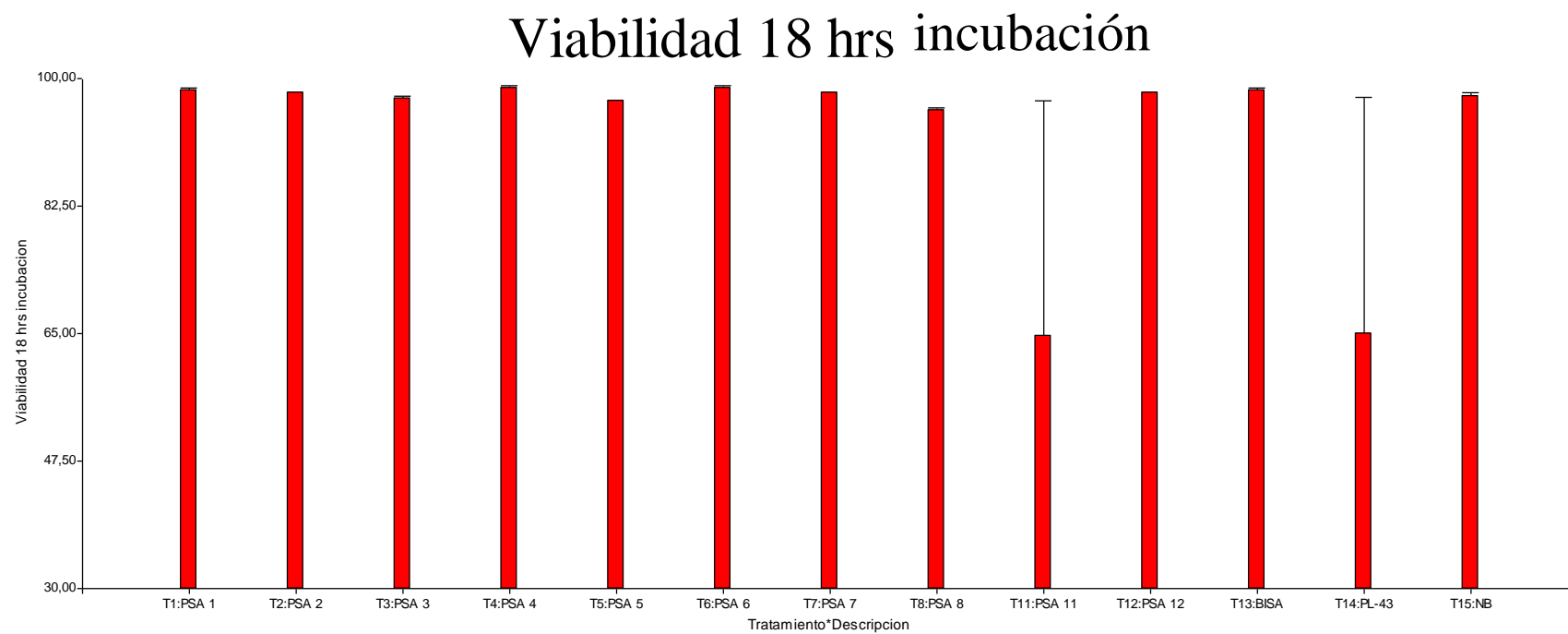
Fuente: autor.

Ilustración 4. Rendimientos de resistencia a UV a 60 segundos



Fuente: autor.

Ilustración 5. Estimación de la viabilidad a 18 horas de incubación



Fuente: autor.

E. Cálculo de costo de producción por dosis, cepas nativas y comerciales

Tabla 19. Costo de producción/ cepa

Cepa	Costo de producción
PSA 1	3,86
PSA 2	5,33
PSA 3	9,14
PSA 4	4,02
PSA 5	13,46
PSA 6	4,04
PSA 7	3,93
PSA 8	16,63
PSA 9	0,00
PSA 10	0,00
PSA 11	22,99
PSA 12	9,35
BISA	3,95
PL- 43	8,27
Nb	6,66

Fuente: autor.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tras la recolección de insectos y su incubación en el laboratorio, la cantidad resultante de individuos parasitados con el hongo buscado fue baja, 7, principalmente se dieron solo en una finca, Limones, aunque la metodología utilizada fue homogénea, características ajenas al experimento posiblemente intervinieron en la mortalidad manifestada. Las dos muestras de adultos de Saltón coludo obtenidas de CENGICANA, mostraban una esporulación madura, y en su totalidad los insectos que se recolectaron en campo fueron adultos de Chinche salivosa.

La metodología de aislamiento del hongo a través de medio semi selectivos con las muestras de suelo tuvo un resultado negativo para la obtención de cepas nativas, debido a que en las fincas del ingenio hay presencia de otros hongos más antagónicos que *Metarhizium*, como: *Trichoderma sp*, *Aspergillus sp*, y demás, estos presentan un desarrollo más rápido sobre el medio de cultivo, aprovechando los nutrientes presentes e impidiendo el desarrollo de *Metarhizium*. Aunque con la ayuda del inhibidor de crecimiento *mertect 50* se erradicó el crecimiento de algunos hongos como *Aspergillus sp*, no se pudo evitar el desarrollo de *Trichoderma sp*, por ello no se logró extraer al hongo por la vía de medios de cultivo. La técnica de insectos trampa funcionó para la extracción del hongo con las muestras de suelo, adicional se procedió a recolectar muestras de suelo externas al ingenio.

La comparación de cepas por medio del método de puntos tuvo como resultado, que dos de las cepas nativas, PSA 4 proveniente de adulto de chinche salivosa y PSA 6, con procedencia de adulto de saltón coludo, son iguales a la cepa comercial BISA, siendo el resto de las cepas diferentes a las tres comerciales.

En base a los rendimientos obtenidos de cada cepa investigada se ha estimado que la mejor en rendimiento fue PSA 1, con: concentración/gramo 6.09E9, viabilidad 98%, gramos/placa 0.56, porcentaje de resistencia a uv 9, eficiencia de producción 100% y costo de producción \$ 3.86, secuencial a PSA 4 con: concentración/gramo 5.80E9, viabilidad 99%, gramos/placa 0.57, porcentaje de resistencia a uv 5, costo de producción \$ 4.02, y BISA con: concentración/gramo 5.96E9, viabilidad 98%, gramos/placa 0.57, porcentaje de resistencia a uv 12 y costo de producción \$ 3.95.

No existió diferencia estadísticamente significativa, para las cinco cepas sobresalientes por sus características; sin embargo presentaron valores aceptables en comparación a los valores estándar delimitados por los ingenios que se dedican a la producción masiva; estos son: concentración/gramo 5E9, viabilidad 97%, gramos /placa 0.6, porcentaje de resistencia a uv 60 seg 20% y costo de producción \$ 3.95.

VIII. CONCLUSIONES

Aunque se obtuvo un resultado negativo en cuanto al aislamiento de cepas a través de la metodología de medios de cultivo; no se debe descartar el método, la presencia de hongos más antagónicos que *Metarhizium* fue la responsable de ello, además en el ingenio *Pantaleón S.A.* se han aplicado diversidad de hongos, entomopatógenos y otros, lo cual tiene influencia sobre tal metodología. Sin embargo esta puede realizarse en otras ubicaciones adaptada a las condiciones en las que se desee ejecutar, pese a esto se logró aislar 12 cepas con apoyo de otras metodologías para aislar el hongo.

La técnica de insectos trampa por medio de *Galleria mellonella* es muy efectiva para el aislamiento de cepas nativas a partir de suelo, ya que este insecto es susceptible a hongos entomopatógenos, lo cual favorece a que el hongo lo parasite, evitando con esto la presencia de otros hongos que no cumplan con estas características.

Las características que definen a una cepa, pueden variar dependiendo del lugar en donde sean definidas, sin embargo este tipo de investigaciones son de mucha utilidad para poder buscar cepas en vías de mejora productiva. PSA 1 supera en todas sus características, a excepción de gramos/placa, y porcentaje de resistencia a UV al resto de cepas nativas aisladas de las diferentes muestras de suelo, como de insectos plagas, sin embargo aunque su diferencia puede ser notoria para cualquier persona, es necesario recurrir a métodos estadísticos que dicten una variación significativa que pueda tomarse en cuenta para la toma de decisiones en un ingenio que produce de forma magnificada, ya que es necesario contar con una diversidad de cepas con características de alto rendimiento para tener un mayor porcentaje de opciones a seleccionar y llevar a producción.

El costo de producción es un factor determinante en un ingenio azucarero, debido a que el objetivo principal de estos es generar dinero, por ende será necesario seleccionar cepas que disminuyan costos durante el proceso de producción, esto se logra haciendo una clasificación de las cepas según costos, y también aquellas que superen o igualen los parámetros establecidos para tal hongo. La cepa PSA 1 presentó el menor costo de producción \$ 3.86.

Las metodologías presentadas pueden ejecutarse en cualquier parte del país, recordando que cuando se desea llevar a cabo una adaptación de las metodologías de ejecución en los experimentos, hay que analizar los factores que influyan directamente en los resultados y hacer los ajustes necesarios para una réplica exitosa. Toda información generada en un trabajo de investigación es buena solo basta como ya se mencionó; adaptarla a las condiciones en donde se desee implementar.

IX. RECOMENDACIONES

Cuando se desee implementar una investigación similar a la vista en este documento, la mejor forma de aislar el hongo del suelo es por medio de insectos trampa por lo cual se recomienda su uso para tener éxito.

Con la clasificación de procedencia de las cepas realizar pruebas de parasitismo por grupos, siendo en tal caso, de adultos de chinche salivosa, de saltón coludo y de suelo, todas sobre el insecto plaga que se estima controlar, esto con la finalidad de definir el efecto que el hongo aislado de un organismo diferente a su favorito puede tener en él.

Implementar la cepa PSA 1 en producción magnificada para su posterior aplicación en campo, pero para la sustitución de la cepa comercial, será necesario ir de forma paulatina primero el 10% de la cepa nativa y el 90% de la cepa comercial, 20% cepa nativa, 80% cepa comercial, y así sucesivamente hasta sustituirla por completo, esto es con la finalidad de poder observar cambios en las características productivas del hongo de forma magnificada.

Realizar pruebas de dosis letal media para cada cepa nativa.

Llevar a cabo investigaciones sobre virulencia para las cepas nativas.

Proceder a contabilizar la viabilidad a través del tiempo para cada cepa, hasta obtener un 50%, y con ello establecer el tiempo de almacenamiento de cada una.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Biobaro.com. (s.f.). Mosca % 20 pinta % 20 o % 20 Salivazo BIOTRAX Insecticida Biologico. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de BIO-BARO: <http://biobaro.com/contenido/pag%20Biotrax/Mosca%20pinta%20o%20Salivazo.pdf>
- Bodegas. (1973). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>
- Bodegas Varela, P. (1973). *Aspectos biológicos sobre la mosca pinta de los pastos, con énfasis en el*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de SIDALC: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>
- CIAT. (1982). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>
- CIAT. (1982). *Centro de Investigación de Agricultura Tropical. Cercopidos plagas* . Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Centro de Investigación de Agricultura Tropical. Cercopidos plagas: <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2013/06/14/Fernandez-Mauricio.pdf>
- CIAT. (1982). *Programa de pastos tropicales*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Informe anual 1982. 1984.
- Hajek, A., & Leger, R. (1994). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Annual Review of Entomology 39.
- Infoagro. (s.f.). *el_cultivo_cana_azucar.asp El Cultivo de La Caña de Azucar*. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de Infoagro: http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_cana_azucar.asp
- Lecuona, R., Papierok, B., & Riba, G. (1996). *Hongos Entomopatogeos*. Recuperado el 30 de 03 de 2016, de Microorganismos patogenos usados en e control microbiano de insectos plaga.
- Leger et alii, c. p. (1988). *A01-1277-94.pdf Utilizacion de Hongos Entmopatogenos en el Control de Insectos*. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de Ministerio de Agricultura y Ganaderia MAG: http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_ix/A01-1277-94.pdf

Magalhaes, V. y. (1996). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>

Márquez, J. M. (2001). *IX. ++MIP+-Cecilia%20(2) El Manejo Integrado de Plagas*. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de CENGICANA: [file:///C:/Users/HP/Downloads/IX.++MIP+-Cecilia%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/IX.++MIP+-Cecilia%20(2).pdf)

Márquez, J. M. (2001). Manejo Integrado de Plagas. En J. M. Werner Ovalle, *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala* (pág. 3).

Márquez, J. M. (2002). Obtenido de <http://www.cengicana.org/es/publicaciones/libro-de-la-cana-de-azucar>

Menezes. (1983). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>

Menezes, Marques Pereira, J., & Moreno Ruiz, M. (1983). *Bases para o controle integrado das cigarrinhas-das-patagens na regio sudeste da Bahia*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Ilhéus-Bahía CEPLAC: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>

Motta Delgado, P., & Ordoñez, B. (2011). *articulo.oa?id=92819767006 Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de*. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de Sistema de Informacion Cientifica Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92819767006>

Pucheta Diaz, M., Flores Macias, A., Rodriguez Navarro, S., & de la Torre, M. (12 de 12 de 2006). *Articulo.oa?id33901204 Mecanismo de Accion de los Hongos Entomopatogenos*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Sistema de Informaicon Cientifica Redalyc.

Rodríguez. (2003). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>

Sandino, D. (2003). *Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar*. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE,.

Vargas, C. (1970, 1982). Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>

Vicentini, S., & Magalhaes, B. (1996). *Infection of the grasshopper, Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. Recuperado el 28 de 03 de 2016, de Anais da Sociedade Entomologica do Brasil.

Zeno, S. C. (2006). A0748E *Uso de Metarhizium anisopliae para el control biológico del salivazo*. Recuperado el 26 de 03 de 2016, de SIDALC: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E.PDF>

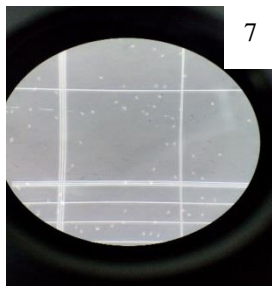
XI. ANEXOS

Ilustración 6. Estufa agitadora



Fuente: autor.

Ilustración 7, 8 y 9. Conteo de conidios en cámara de Neubauer, microscopio utilizado y registro empleado.



7



8

INSTITUCIÓN LA
 INSTITUCIÓN DE INVESTIGACIONES
 LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE AGENTES ANTIFUNGICIDIOS
 CONTEO DE CONIDIOS
 LOTE: 211 FECHA: 10/11/10 Experimentador: Luis Felipe Jara
 APPA: 000-3
 VALORES OBTENIDOS

204	202
190	198
198	210
202	206

 SOLUCIONES

020	0	0	0
01	1	1	1

 I: 201/201
 X: 201/201
 DS: 1/01
 CV: 3
 CD: 10.04.10
 201.25x10⁶ x 10⁶ x 3x10¹¹

9

Fuente: autor.

Ilustración 10. Cámara de flujo laminar



Fuente: autor.

Ilustración 11. Conteo de conidos



Fuente: autor.

Ilustración 12 y 13. Cosecha y empackado



Fuente: autor.