

Dirección General de Educación Superior Tecnológica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL HONGO
ENTOMOPATÓGENO Metarhizium anisopliae EN EL
LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM.

Informe final de Residencia Profesional que presenta la C.
BARAJAS RODRÍGUEZ ELIZABETH

Número de control:

09870073

Asesor Interno:

M. EN C. LAURA ISABEL SANJORES LARA

Carrera:

Ingeniería en Agronomía

Juan Sarabia, Quintana Roo
Diciembre 2013



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de INGENIERO AGRÓNOMO, Elizabeth Barajas Rodríguez; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno M en C. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el M en C. Emilio Te Góngora y el revisor el M en C. Jaime D. Sosa Madariaga, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo recepcional titulado: "Manejo y Producción del Hongo Entomoptógeno *Metarhizium anisopliae* en el Laboratorio de Control Biológico del ITZM" que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE

Asesor Interno


M en C. Laura Isabel Sansores Lara

Asesor Externo


M en C. Emilio Te Góngora

Revisor


M en C. Jaime D. Sosa Madariaga

Juan Sarabia, Quintana Roo, Diciembre, 2013.

INDICE

Contenido

I. INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	3
III JUSTIFICACION ACADEMICA	3
IV MARCO TEORICO	5
4.1 Importancia económica.....	5
4.2 Claves para estas especies	6
4.3 Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos	7
4.4 Estructuras morfológicas	11
V METODOLOGIA	12
VI Resultados y discusiones.....	17
VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN.....	19
VIII APORTE AL PERFIL PROFECIONAL	20
IX BIBLIOGRAFIA	20
X ANEXOS	22
XI GLOSARIO	24

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro 1.1 Clasificación parcial de hongos, con lista de principales géneros entomopatógenos.....11,12,13.

Figura 1.Preparación de material y equipo de laboratorio para siembra de matrices, A) Calentamiento del Medio de cultivo (Sabouraud), B) Autoclave, marca: Felisa y C) Cajas Petri y tubos de ensaye para las matrices.....15

Figura 2. Siembra A) Cepa de CESA VEQROO con dispersante para inocular y B) Matrices del Laboratorio de control biológico del ITZM.....16

Figura 3. Lavado del arroz en el laboratorio de control biológico del ITZM, A) Frasco Enderoxil al 10 %, B) Lavado del arroz, C) Secado y D) Embolsado.....17

Figura 4. Inoculación de *Metarhizium anisopliae* en el arroz.....17

Figura 5A Las bolsas se colocan en anaqueles en línea.....18

Fig. 6.- Técnica de producción de cultivos sólidos (Mijangos, 2010).....19

Manejo y producción del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio de control biológico del ITZM.

RESUMEN

En la investigación se realizó el proceso de producción del bio-plaguicida *Metarhizium anisopliae*, específicamente las etapas de pre-tratamiento, se realizó la técnica de siembra directa, es decir, a partir de un medio sólido se procedió a sembrar en el arroz, con la finalidad de la obtención de cultivos libres de contaminantes, de esta forma determinamos la efectividad del cultivo: en dónde podemos decir, que en el cultivo sólido hay una producción libre de contaminantes.

I. INTRODUCCION

La protección de cultivos contra plagas de insectos aun es dominada por los plaguicidas químicos, Las ventajas de insecticidas a escala mundial en 1995 alcanzaron \$8.75 billones de dólares, de los cuales únicamente 1.5 a 2 % correspondían a biopesticidas (Alatorre, 2006). Un informe de mercado Europeo revela que la tasa de crecimiento anual es del 10.1%, con tendencia a aumentar (González-Coloma *et al.*, 2007). Debido a la continua e intensa presión selectiva se ha propiciado la aparición de plagas resistentes que requieren dosis cada vez más elevadas de insecticidas. Más de 400 plagas de insectos han desarrollado resistencia a estos productos y además, aparece en un número aun mayor después de cada tratamiento, debido a que también son eliminados sus enemigos naturales, así como los de plagas secundarias, que al quedar fuera de control

pueden rebasar el umbral económico y producir pérdidas considerables (Mier *et al.*, 1994). Todo esto han asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas incluyendo los hongos entomopatógenos (Alatorre, 2006). El mercado principal de los bioplaguicidas lo constituye la agricultura ecológica, cultivos bajo plástico, parque y jardines. (González-Coloma *et al.*, 2007). Los productos formulados con hongos entomopatógenos, constituyen solo una pequeña fracción de los biopesticidas.

Se reconocen tres requerimientos específicos para la producción comercial y uso exitoso de hongos *Metarhizium anisoplae* y como agentes de control de insectos. **Primero** el aislado del hongo seleccionado para producción masiva debe tener crecimiento rápido, abundante esporulación y patogenicidad suficientemente alta sobre la plaga blanco.

Segundo, los costos de producción deben ser mínimos, esto se puede desarrollar logrando un medio que sea simple, barato, disponible en cantidades suficientes y un procedimiento de producción fácil y con un mínimo de labor.

Tercero, el producto debe ser convenientemente formulado para su almacenamiento por largo tiempo bajo condiciones naturales o cercanas a estas sin pérdida significativa de su viabilidad (Fonseca, 2002).

En un esfuerzo por evitar tales problemas, los cultivadores de caña vienen utilizando insecticidas químicos, como única alternativa para controlar estas plagas. Esta práctica, lejos de ser una solución duradera, económica y ecológica, ha traído como consecuencia la ruptura del equilibrio biológico del agro-ecosistema, con manifestaciones evidentes de resurgencia de plagas claves, surgimiento de nuevas plagas y, problemas relacionados con la salud y el medio ambiente (Mendoza. 2001).

En el presente documento se plantean el uso del insecticida biológico como una alternativa de control menos nociva que el uso de agroquímicos. Los que nos lleva al conocimiento de los principales hongos entomopatógenos así como el modo de acción y las estrategias de manejo, sus diferentes formulaciones y los controles de calidad de los bioformulados para mostrar el potencial que tienen como reguladores en el control de insectos plaga.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Producción de *Metarhizium anisopliae* en arroz esterilizado en el laboratorio de control biológico en el ITZM.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar la producción masiva del hongo *Metarhizium anisopliae* en el medio de cultivo (arroz) obtenido de un cultivo sólido.

III JUSTIFICACION ACADEMICA

La residencia profesional es la actividad académica realizada durante el desarrollo de un proyecto o la aplicación de un modelo, en cualquiera de las áreas de colocación establecidas, que definan una problemática y propongan una solución viable, a través de la participación directa del estudiante, aplicando los conocimientos de su propia formación. Lo que se plantea en este trabajo es medir la efectividad del hongo entomopatógeno con fines de producción, dado a las áreas colindantes, las cuales son una zona de producción de caña, y como se sabe el hongo *Metharizium anisopliae* es un hongo que ataca principalmente

mosca pinta (*Aeneolamia sp.*) causante del salivazo en dicho cultivo, al alcanzar la producción de alta calidad de este, así como cantidad se cubriría la demanda de productores, siendo este un producto no tóxico para el medio ambiente y económico, de igual manera es recomendable su uso sin temor a que dañe al ser humano. En virtud de que el ITZM se encuentra dentro de la zona cañera del municipio de O.P.B. y siendo una institución con formación y enfoque agrícola, se pretende con el presente proyecto producir el hongo entomopatogeno con la calidad necesaria, para controlar la infestación de mosca pinta.

La producción de hongos entomopatogenos aporta uno de los recursos que dispone la Agroecológica para ampliar el mercado de exportación de productos agrícolas en general. Ya que los productos tratados con alternativas biológicas alcanzan mayor valor en el mercado regional, nacional e internacional. La producción de hongos entomopatogenos genera fuentes de empleos en su proceso de producción, así como un ahorro directo al ser económicos y un ahorro indirecto por la suspensión de importaciones de agroquímicos

IV MARCO TEORICO

4.1 Importancia económica

Más de 400 plagas de insectos han desarrollado resistencia a productos químicos de elevado precio en el mercado, así como también aparece en un número aun mayor después de cada tratamiento, debido a que también son eliminados sus enemigos naturales, así como los de plagas secundarias, que al quedar fuera de control pueden rebasar el umbral económico y producir pérdidas considerables (Mier *et al.*, 1994). Todo esto ha asegurado el creciente interés en estrategias alternativas para el manejo de plagas incluyendo los hongos entomopatógenos (Alatorre, 2006). El mercado principal de los bioplaguicidas lo constituye la agricultura ecológica, cultivos bajo plástico, parque y jardines. (González-Coloma *et al.*, 2007). Los productos formulados con hongos entomopatógenos, constituyen solo una pequeña fracción de los biopesticidas.

Identificación de *Metarhizium anisopliae*

El conidióforo es ramificado, el conidio inicial es producido por el conidióforo en una abstricción simple en la parte distal. En cada conidióforo se forma una cadena de conidias basipetala, las cuales crecen densas y adheridas una con otras formando masas prismáticas de columnas. Las conidias de este género son blancas cuando son jóvenes, pero conforme maduran el color se torna verde oscuro. Tulloch citado por los mismos autores agrupa solamente a dos especies *M. anisopliae* y *M. flavoride*.

4.2 Claves para estas especies

Conidia elipsoide con las terminaciones redondeadas o una de ellas ligeramente truncada, colonias de gris, amarillo verde u oliváceas.....*M. flavoride*

Conidia cilíndrica u oval frecuentemente angosta en la parte media, usualmente truncada en ambos lados, colonias verdes.....*M. anisopliae*

Conidias de 3.5-9.0 micrómetros de largo usualmente 5.0- 8 μm*M. anisopliae* var. *Anisopliae*

Conidias de 9.0 – 18 μm de largo usualmente 10-14 μm ...*M. anisopliae* var: *mayor*

Fue uno de los primeros microorganismos en ser usado para el control biológico de insectos. Fue aislado por Metschnikoff de *Anisopliae austríaca* Herbst (1879) y fue descrito por Sorokin (1883).

Este hongo es considerado cosmopolita, pues se reporta en distintos lugares del mundo, esto se debe a su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Berlanga y Hernández, 1999a). Es un parásito autónomo que puede crecer o bien como parásito de insectos o como saprofita, tiene un amplio rango natural de insectos huéspedes: 204 especies de 7 órdenes (ortópteros, hemípteros, dípteros, lepidópteros, dermápteros, himenópteros y coleópteros). El hongo es principalmente un parásito de los coleópteros en la naturaleza.

El primer uso de *Metarhizium anisopliae* como agente microbiológico para atacar insectos fue en “1879 cuando Elie Metchnicoff realizó experimento con escarabajos del grano de trigo”. El empleo de hongos entomopatógenos en el campo, comenzó a finales del siglo XIX, sin embargo fue en Brasil a partir de 1964 cuando adquirió importancia su estudio por parte de los investigadores, después de la aparición epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre cercópodos de la caña de azúcar. “Se ha producido y aplicado este entomopatógeno hasta en 100.000 ha/año de caña de azúcar para el control de *Mahanarva posticata* en todo el mundo”. A partir de 1996, tras una plaga masiva en los cultivos de caña de azúcar, la producción de hongo *Metarhizium anisopliae* tomó importancia dentro de la industria guatemalteca. Los hongos entomopatógenos, constituyen hoy en día, el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga,

principalmente en los chupadores o succionadores ya que estos no pueden ingerir patógenos que infectan a través del tracto digestivo. “*Metarhizium anisopliae* ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes”. Durante los años sesenta y setenta, debido a la problemática presentada en el cultivo de algodón, “en Guatemala se establecieron una serie de métodos denominados Manejo Integrado de Plagas (MIP)”, dentro de los que se incluían los primeros métodos biológicos para el control de plagas utilizando parásitos, depredadores y entomopatógenos. Es del MIP de donde data método tradicional de producción de hongos entomopatógenos aplicado en Guatemala.

Hasta la fecha se han evaluado “diferentes tipos de sustratos naturales para el crecimiento del hongo, como maíz, frijol, soya, arroz y trigo; pero los más utilizados son arroz y trigo”. Con el paso de los años se ha modificado el proceso de producción, existiendo hasta el momento tres métodos de producción de hongos entomopatógenos: artesanal, semiartesanal e industrial. “En Guatemala y Centro América se utiliza el método semiartesanal”.

Actualmente acerca del proceso de producción del hongo sólo existe un documento llamado “Producción y manejo del hongo *Metarhizium anisopliae*”, publicado por CENGICAÑA en julio de 1998. En dicho documento se describen paso a paso los parámetros de producción para el desarrollo del hongo. El método descrito es el método estándar utilizado desde los inicios del MIP en Guatemala. Adicional a esto también explica la aplicación de cepas desarrolladas por CENGICAÑA, y que han presentado mejores resultados en los campos de aplicación.

4.3 Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos

Según la clasificación taxonómica hecha por Ainsworth (1973), la cual separa los hongos en dos divisiones: Myxomycota por formar plasmodios y Eumycota por no formarlos y ser frecuentemente miceliales. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota, y en las subdivisiones: Mastigomycotina,

Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina. (Alean, 2003; Tamez *et al.*, 2007)

Los Deuteromycotina, mejor conocidos como hongos imperfectos por no presentar estado sexual, presentan la clase Hyphomycetes la cual se caracteriza por formar micelio septado con un conidióforo simple o agrupado y la identificación de los géneros se basa en la forma en que se originan las conidias en el conidióforo (Berlangua, y Hernández, 1996b), estos hongos son los entomopatógenos más importantes ya que incluye a la mayoría de las especies conocidas como patógenos de insectos e incluyen a los de géneros considerados como promisorios en el control microbiano por incremento (Berlangua, 2004).

Cuadro 1. Clasificación parcial de hongos, con lista de principales géneros entomopatógenos.

SUBDIVISION	CLASE		ORDEN
GÉNERO			
Mastigomicotina	Cytridiomycetes	Cytridiades	<i>Coelomicidium</i> <i>Myiophagus</i>
	Oomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomices</i>
		Lagenidiales	<i>Lagenidium</i>
		Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
	Zygomycetes		
		Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
		Entomophthorales	<i>Conidiobolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i>
Ascomycotina	Hemiascomycetes		<i>Erynia</i>

			<i>Massospora</i>
			<i>Meristacrum</i>
			<i>Neozygites</i>
	Plectomycete		<i>Blastodendrion</i>
	Pyrenopmycetes		<i>Metschnikowia</i>
		Endomycetales	<i>Mycoderma</i>
			<i>Sacharomyces</i>
	Laboulbeniomyces		
			<i>Aschosphaera</i>
Basidiomycotina			<i>Cordyceps</i>
	Loculoascomycetes	Ascosphaerales	<i>Torrubiella</i>
		Sphaeriales	<i>Nectria</i>
			<i>Hypocrella</i>
Deuteromycotina	Pharagmobasidiomycetes		<i>Calonectria</i>
		Laboulbeniales	<i>Filariomyces</i>
			<i>Hesperomyces</i>
			<i>Trenomycetes</i>
		Myrangiiales	
	Hypomycetes		<i>Myrangium</i>
			<i>Podonectria</i>
		Septobasidiales	
			<i>Filobasidiella</i>
			<i>Septobasidium</i>
			<i>Uredinella</i>
		Moniliales	<i>Akanthomyces</i>
			<i>Akanthomyces</i>
			<i>Aspergillus</i>
			<i>Beauveria*</i>
			<i>Culicinomyces</i>

Coelomyces
Micelia-Steril

Sphaeropsidales

Engyodontium
Fusarium
Guibellula
*Hirsutela**
Hymenostible
*Metarhizium**
Nomuraea
*Paecilomyces**
Paraisaria
Pleurodesmospora
Ploycephalomyces
Pseudogibellula
Sorospora
Sporothrix
Strilbella
Tretranacrium
Tilachlidium
Tolypocladium
*Verticillium**

*Aschersonia**
Aegerita

Adaptada por McCoy et al. 1988 y Samson et al. 1988

*Géneros factibles a producción masiva.

La clasificación de los hongos entomopatógenos es paralela al sistema establecido para hongos en general, por lo que el criterio taxonómico utilizado

para su clasificación es fundamentalmente basado en sus características morfológicas, sin embargo recientemente se han considerado algunos aspectos fisiológicos, bioquímicos, y genéticos por la necesidad que ha surgido de realizar caracterizaciones más precisas entre aislamientos de la misma especie (Berlanga, 2004).

4.4 Estructuras morfológicas

Metarhizium anisopliae forma conidióforos simples o agregados, posee conidias alargadas, ovoides o cilíndricas dispuestas en cadenas, originadas de conidióforos en forma de botella. Las conidias miden de 6 a 8 micras, son verde olivo, por lo que la enfermedad de los insectos se denomina “muscardina verde” (Berlanga y Hernández 1999a). Tiene dos variedades *M. anisopliae* var. *anisopliae* con conidios de 3.5 - 9.0 μm de largo usualmente 5.0 - 8.0 μm y *M. anisopliae* var. *Mayor* (Johnston) *Tulloch* cuyos conidios miden 9.0 – 18.0 μm de largo usualmente entre 10 – 14 μm (Berlanga, 2004).

Las características generales en la infección ocasionada por un hongo consideran ninguno o pocos síntomas en los estados iniciales del desarrollo de la enfermedad, observándose en algunos casos algunas manchas necróticas desarrolladas en los sitios de penetración o invasión del hongo. Conforme avanza la infección el insecto se observa agitado, pierde actividad, su apetito se reduce y pierde coordinación, frecuentemente el hospedero cambia de color. Igualmente se dice que existe tendencia de los insectos a desplazarse hacia la superficie del suelo, ya sea de la parte alta del follaje o de la parte subterránea, en el caso de plagas rizófagas. Eventualmente el insecto se paraliza y después de la muerte es rápidamente cubierto por micelio, siendo la característica más notable de la infección por hongos la momificación del cuerpo del insecto, el cual conserva su tamaño y forma.

Bajo condiciones ambientales adversas, las hifas pueden producir estructuras de resistencia que se caracterizan por presentar pared celular gruesa, llamadas clamidiosporas las cuales los mantienen viables por tiempo prolongado.

Los estados resistentes de algunos hongos entomopatógenos se encuentran en el suelo cuando los estados susceptibles del huésped no están presentes, las esporas de *Metharizium anisopliae* pueden sobrevivir viables al menos dos años en algunos tipos de suelo.

V METODOLOGIA

Descripción del proceso de producción

5.1 Preparación del medio de cultivo (Matrices)

Se pesaron 26 gramos del medio de cultivo PDA (Papa dextrosa Agar), para disolver en un total de 400ml de agua. Posteriormente se distribuyeron en los tubos de ensaye a partes iguales con un total de 10 ml por tubo tapados con algodón y 20 ml por cajas petri, los cuales se colocaron en la autoclave (automática, marca-Felisa) para su esterilización posteriormente se colocaron los tubos a cierto grado de inclinación para la solidificación.

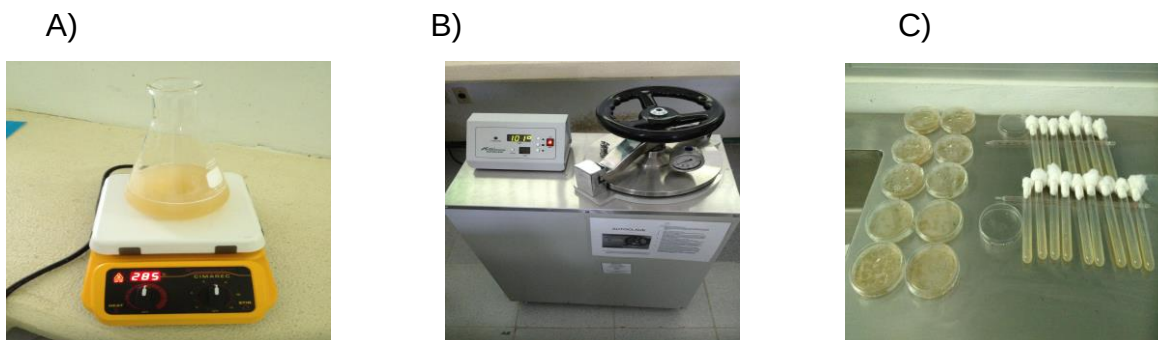


Figura 1. Preparación de material y equipo de laboratorio para siembra de matrices, A) Calentamiento del Medio de cultivo (Saburad), B) Autoclave, marca: Felisa y C) Cajas Petri y tubos de ensaye para las matrices.

5.2 Siembra del hongo en las matrices.

Se esterilizo el asa platino, se prepararon dos mecheros y se esterilizo la campana, con hipoclorito al 5 %, igualmente se flameo el área de siembra, posteriormente se llevó a cabo la siembra del hongo obtenido de la cepa donada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEQROO) (Figura 2).



Figura 2. Siembra A) Cepa de CESAVEQROO con dispersante para inocular y B) Matrices del Laboratorio de control biológico del ITZM.

Preparación de material y equipo de laboratorio para siembra en arroz.

5.3 Preparación de las bolsas con arroz

El arroz antes de ser embolsado se lavó y desinfectó con antibiótico Enderoxil al 10% (Figura 3-A) e hipoclorito con una ligera agitación de granos, colocándolo en una malla, por debajo una tina de plástico (Figura 3-B). Se colocarán 200 gr aproximadamente de arroz dependiendo del tamaño de las bolsas, las cuales se sellan, engrapan o amarran, para evitar que entren contaminantes, dejando la mitad del volumen de aire (Figura 3-C). Estas bolsas se esterilizan en autoclaves a una presión constante de 15 libras de presión por 20 minutos. Posteriormente se dejan enfriar y reposar por 24 horas.

A)



B)



C)



D)



Figura 3. Lavado del arroz en el laboratorio de control biológico del ITZM, A) Frasco Enderoxil al 10 %, B) Lavado del arroz, C) Secado y D) Embolsado.

5.4 Inoculación de las bolsas

Se esterilizo 400ml de agua con 0.5 ml de antibiótico y 0.01ml de dispersante, posteriormente se tomaron 20ml para colocarlos en dos tubos de ensayo 10 ml para cada uno de dicha solución. Ya esterilizado y frío, se procedió con la dilución de los 10ml de agua estéril sobre la cepa del hongo *Metarhizium anisopliae* (figura 4), siempre quemando la entrada del tubo para evitar la contaminación, después se vació en el matraz con el resto del agua, se colocó la manguera con la pistola, previamente esterilizado para luego inyectarlo en las bolsas, dando dos inyecciones por bolsa, es decir, un total de 20 ml para cada bolsa (figura 4), esto se realizó en un área estéril o dentro de una campana de flujo laminar, se sella el orificio de entrada con cinta adhesiva, y se mueven las bolsas para distribuir homogéneamente el inóculo y tenga un buen desarrollo, se trasladan a la sala de incubación para su crecimiento, a una temperatura de 25-27 °C en un lapso de 3 a 4 semanas para su cosecha, se homogenizan cada tercer día según su crecimiento (figura 4-B).



Figura 4. Inoculación de *Metarhizium anisopliae* en el arroz

5.5 Traslado a sala de maduración.

La sala de maduración deberá de tener un fotoperiodo de 14 horas luz, con temperaturas promedio de 27 ± 2 °C Las bolsas se colocan en anaqueles en línea (figura 5A) y será removido el arroz cada 96 horas para romper el micelio, para romper las estructuras de micelio en los primeros 12 días de la siembra y con ello obtener la mayor cantidad de esporas libres. El tiempo requerido para tener una máxima cantidad de esporas es de 15 a 20 días dependiendo del hongo que se esté produciendo (figura 5B).



(Figura 5A) Las bolsas se colocan en anaqueles en línea



(Figura 5B) cantidad de esporas es de 15 a 20 días dependiendo del hongo que se esté produciendo.

VI Resultados y discusiones

Cosecha de *Metarhizium anisopliae*

6.1 Obtención de esporas

Cuando las esporas ya alcanzaron su madurez, son extraídas del sustrato utilizando una tina con una malla mosquitera fijándola con cinta masquick tape, posteriormente se vertió una bolsa del arroz con el hongo sobre la malla y 20gr de diatomita ya que esta le servirá al hongo para evitar la humedad. Por último se pone a secar en una charola con papel estraza, para posteriormente ser dosificado. El polvo que se obtiene contiene conidias y micelio mas las partículas de arroz. La extracción puede ser de forma manual por tamizado y frotación o con equipos mecánicos.

A)



B)



Figura 5. Cosecha de *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio de control biológico del ITZM, A) Tamizado del arroz y B) Secado

Se obtuvo una viabilidad de 1×10^6 , lo que nos permite concluir que *Metarhizium anisopliae* tiene una alta calidad para poder ser aplicado en el cultivo de caña.

Los resultados presentados en este ensayo, con las condiciones nutritivas y el volumen de oxígeno utilizado, demuestran las potencialidades del aislamiento CESAVEQROO de *M. anisopliae* para ser reproducido masivamente.

6.2 Discusiones

Uno de los trabajos más recientes es el realizado por CESAVEQROO (2010), en donde se obtienen dosis para más de 100 productores (Figura 6).

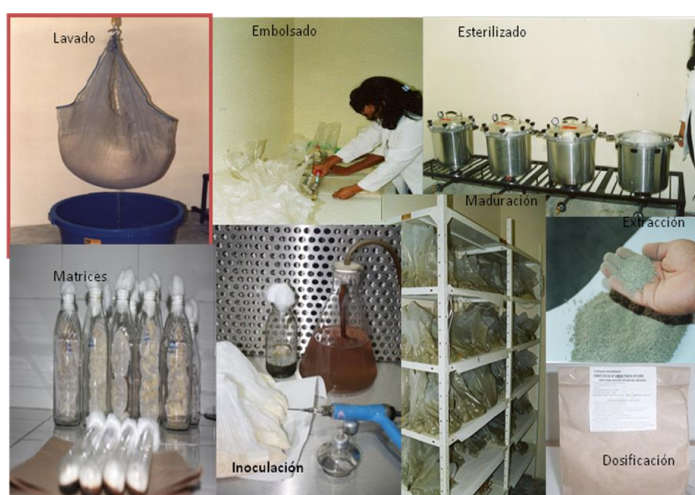


Fig. 6.- Técnica de producción de cultivos sólidos (Mijangos, 2010).

Usando la metodología del laboratorio del CESAVEQROO, se obtuvo la dosis de hongos similar a la producida en dicha institución.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

7.1 CONCLUSIONES

Los hongos entomopatógenos requieren de condiciones ambientales adecuadas para su establecimiento y desarrollo de epizootias, por lo que su uso debería sincronizarse con momentos en que las condiciones ambientales sean más favorables para su desarrollo y no basar su aplicación a umbrales preestablecidos, similar a los utilizados para la aplicación de agroquímicos, al menos para su uso en pastizales. Las epizootias de los entomopatógenos surgen hasta que las condiciones ambientales son adecuadas para su reproducción y dispersión.

Tomando de referencia este y algunos otros trabajos, podemos concluir que obtuvimos un protocolo eficiente para en un futuro, producir de forma masiva el hongo entomopatogeno *Metarhizium anisopliae*.

De igual forma esta producción va dirigido a los productores de caña de azúcar por el gran impacto que tiene con la mosca pinta.

Se demostró que el aislamiento de la sepa donada por el CESAVEQROO de *M. anisopliae* pudo ser reproducido mediante el método bifásico, donde se utilizó un medio líquido basado en levadura y sacarosa y un sustrato sólido a base de arroz, lográndose un producto con una alta concentración de conidios, en un tiempo menor que el requerido para el proceso convencional sobre un sustrato sólido. Los resultados obtenidos constituyen aportes a futuras metodologías para la producción masiva y formulación de este aislamiento.

VIII APOORTE AL PERFIL PROFECIONAL

Con esta investigación se pretende que se reduzca el uso de bioinsecticida. Que el productor reduzcan los costos de producción.

El uso de hongos entomopatógeno podría ser una alternativa apropiada para el control de plagas.

Los químicos son dañinos para el ambiente y la humanidad y estos hongos nos pueden servir como controles biológicos.

Realizar estudios más profundos del comportamiento del hongo nativo en el lugar detectado y en áreas aledañas, para conocer mejor su potencial.

Existe la necesidad de disponer de productos biológicos que se haya probado su efectividad bajo condiciones ambientales de campo.

Registrar y producir comercialmente el bioplaguicida a base de sustrato solido para que esté disponible para los agricultores.

IX BIBLIOGRAFIA

HERRERA, J. Welcome to Herrera's Microfungi Home Page. [en línea] División of Science. Truman State University. Kirksville. Abr 2001. [citado marzo, 2003].

http://www2.truman.edu/~jherrera/Anamorphic_fungi/genera_.html

MALLOCH, D. MOULDS: Isolation, cultivation, identification. Department of Botany, University of Toronto. 1997 [citado marzo, 2003].

<http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>

METEOS, G. 2009. Mantenimiento y conservación de microorganismos industriales <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html>

Moschetti, R. 2003. Technical Bulletin: GREENHOUSE MANAGEMENT SERIES, The Problem: APHIDS.

<http://www.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/Hort/screens/The%20Problem%20Aphids.htm>

Carnet Photographique Emmanuel Buchot. "La economía de Guatemala y su agricultura" [en línea]. Enciclopedia en carta, 12 de enero de 2008 [Ref. de 25 de noviembre de 2009]. Disponible en web: <http://www.voyagesphotosmanu.com/economia_guatemala.html>.

CASTILLO ZENO, Salvador. "Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala" Turrialba, Costa Rica, 2006. 183 p.

CADENA PRODUCTIVA DEL ARROZ (GST). *Convenio de Comercialización de la cadena productiva del Arroz*. Guatemala: 2006.

HERNÁNDEZ SAMPIERI, Roberto C. *Metodología de la Investigación*.

4ª. Edición. México: McGraw Hill, 1997. 298 p.

INFORME ANUAL 2008-2009. Centro Guatemalteco de Investigación y

Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. Guatemala:

enero

2010. 56 p.6. *Información Técnica Sobre el Agente de Control Biológico*

Metarhizumanisopliae. Centro Panamericano de Ecología

Humana y Salud. 1984 n° 1. México: enero 1984. 497 p.

ORTON. catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF.

X ANEXOS

De acuerdo al proceso establecido para la producción de *Metarhizium anisopliae*, el laboratorio debe disponer de las siguientes salas o ambientes: sala para matrices, sala para preparación del sustrato, sala para inoculación, sala para crecimiento del hongo y sala para el secado. Los requisitos mínimos en cada una de estas salas son los siguientes:

Sala para matrices. En esta sala se mantienen las matrices, para lo cual se puede disponer de una incubadora a 27 °C y con luz permanente. Si no se dispone de la incubadora, las matrices se pueden mantener al ambiente con temperatura de 26 a 28 °C. Además, en esta sala se debe disponer de una nevera, un microscopio y la cámara de Neubauer.

Sala para preparación de medios de cultivo y el sustrato de arroz. En esta sala se realiza el proceso de preparación de los medios de cultivos y, esterilización del arroz. Los equipos necesarios para este proceso son la autoclave, una cocina

industrial de dos hornillas, una balanza electrónica y una refrigeradora. Los medios de cultivo, antibióticos y el agua destilada estéril se deben conservar en refrigeración (4 a 8°C).

Sala para inoculación. En esta sala se efectúan los aislamientos e inoculación del hongo en los medios de cultivo (cajas petri, matrices) y en el sustrato de arroz. Para este proceso se requiere de una cámara de flujo laminar o una cámara de aislamiento con luz ultravioleta, un mechero a gas o alcohol, un plato agitador calentador y un vortex. Esta sala debe disponer de un acondicionador de aire y se debe mantener en condiciones de asepsia.

Sala para crecimiento del hongo. En esta sala se mantienen las fundas inoculadas durante el tiempo que requiere la fase de crecimiento y esporulación del hongo. Las fundas se colocan individualmente en los estantes metálicos evitando su aglomeración.

Esta sala se debe mantener entre 26 a 28°C, humedad relativa del 80% y fotoperiodo de 8 horas. Para mejorar las condiciones de humedad de esta sala se recomienda el uso de un humidificador.

Sala de secado del hongo. Esta sala debe ser independiente de las otras salas, debe tener buena ventilación, temperatura no mayor a 28 °C, humedad relativa menor a 70 % y no permitir la entrada de rayos solares, para esto se puede colocar en las ventanas una película antisolar. Para mejorar las condiciones de secado de esta sala se puede disponer de un acondicionador de aire encendido.

Nota: Todas las salas requieren de buenas condiciones de limpieza y desinfección, especialmente las salas para mantenimiento de matrices, inoculación y crecimiento del hongo. Esta desinfección debe hacerse diariamente con una mezcla de amonio cuaternario, a razón de 13 ml por litro de agua; ó, hipoclorito de sodio al 0.25 %.

XI GLOSARIO

Vortex.- es un dispositivo simple que se usa comúnmente en los laboratorios para agitar pequeños tubos

Película antisolar.- un conjunto de capas múltiples de hojas de poliéster muy finas que contienen diversos tipos de metales y son capaces de reflejar por completo los rayos ultravioletas y limitar el paso de los rayos infrarrojos, dejando paso libre a la radiación luminosa.

Conidios.- Un conidio es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena. Aparecen en hongos: Zygomycetes, Ascomycetes y algunos Basidiomycetes.

Bifásico.- que tiene dos fases, partes, aspectos o estadios.

Diatomita.- La diatomita pura está formada por silica opalina o hídrica, presentando en solución sólida o como una parte esencial del complejo de opalo, pequeñas cantidades de componentes inorgánicos asociados – alumina, hierro, tierras alcalinas, metales alcalinos – y otros constituyentes menores.

Epizootia. Enfermedad epidémica del ganado

Micelio.- es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores.

Hifas.- las hifas son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa.

