

Dirección General de Educación Superior Tecnológica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM.

**Informe final de Residencia Profesional que presenta la C.
LUGO VALDEZ JOSÉ MANUEL**

Número de control:

09870085

Asesor Interno:

M. EN C. LAURA ISABEL SANSORES LARA

Carrera:

Ingeniería en Agronomía

Juan Sarabia, Quintana Roo
Diciembre 2013



ITZM

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA
EJIDO JUAN SARABIA, QUINTANA ROO**



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, José Manuel Lugo Valdez; 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 Entomopatógeno *Beauveria bassiana* 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.

MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM.

RESUMEN

La investigación que se realizó en el laboratorio del control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya en el proceso de producción del bioplaguicida *Beauveria bassiana* específicamente en las etapas de siembra de matrices, se utilizó la técnica de siembra directa, es decir, a partir de un medio sólido se procedió a sembrar en tubos de ensayo con agar, con la finalidad de la obtención de cepas libres de contaminantes, para posteriormente sembrar en el arroz, de esta forma determinaremos la efectividad del cultivo principalmente la calidad y cantidad de *Beauveria bassiana*.

CONTENIDO

Portada	iii
Página de firmas	iii
Resumen.....	iii
CONTENIDO	iv
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	v
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	4
III JUSTIFICACION ACADEMICA	5
IV MARCO TEORICO.....	6
V METODOLOGÍA	14
VI RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
VII CONCLUSION Y RECOMENDACIONES	25
VIII.- GLOSARIO	26
IX.- BIBLIOGRAFIA.....	27
X.- ANEXOS.....	29

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Página
Figura No. 1.- pesando el agar.....	15
Figura No. 2.- autoclave marca Felisa.....	15
Figura No. 3.- depositando el agar en matraz.....	15
Figura No. 4.- cocinando el agar.....	15
Figura No. 5.- enfriando el agar.....	16
Figura No. 6.- Esterilizando la campana.....	16
Figura No. 7.- Cepa de CESAVEQROO.....	16
Figura No.8.- Sembrando en tubos de ensayo.....	17
Figura No. 9.- Esterilizando el aza.....	17
Figura No.10.- Sembrando en tubo.....	18
Figura No. 11.- tomando el hongo con el aza.....	18
Figura No. 12.- Sembrando en caja de Petri.....	18
Figura No. 13.- Sellando la caja de Petri.....	18
Figura No.14.- Material ya sembrado.....	18
Figura No. 15.- Hongo desarrollado.....	19
Figura No. 16.- Hongo en matriz.....	19
Figura No. 17.- Matrices al refrigerador.....	20
Figura No. 18.- cajas de Petri almacenadas.....	20
Figura No. 19.- Cepas en el refrigerador.....	20
Figura No. 20.- Lavado de arroz.....	21
Figura No. 21.- Escurriendo el arroz.....	21

Figura No. 22.- Embolsando el arroz.....	21
Figura No. 23.- Inoculando el arroz.	21
Figura No. 24.- Armando el equipo.....	23
Figura No. 25.- inyectando <i>beauveria b</i>	23
Figura No. 26.- Homogenizando el arroz.....	23
Figura No. 27.- En incubación.....	24
Figura No. 28.- Cosecha del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	25

I INTRODUCCIÓN

Beauveria bassiana es un hongo deuteromiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo. Es un producto biológico su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a Insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca de la muscardina.

Pertenece a los hongos entomopatógenos y actualmente es utilizado como Insecticida biológico o Biopesticida controlando un gran número de Parásitos de las Plantas como son las Orugas, las Termitas, las Moscas blancas, los Áfidos, los Escarabajos o los Tisanópteros.

Este control biológico se aplica a una buena variedad de cultivos de importancia agrícola como: Viandas, Granos y Hortalizas.

La protección de cultivos contra plagas de insectos aun es dominada por los plaguicidas químicos, Las ventas 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 aún 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 *Beauveria bassiana* 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 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 *Beauveria bassiana* en arroz esterilizado en el laboratorio de control biológico en el ITZM.

2.2 Objetivos específicos

1.-Producción de matrices del hongo *Beauveria bassiana* en el medio de cultivo (agar) obtenido de una cepa madre.

2.-Producción masiva del hongo *Beauveria bassiana* 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 cultivos, y como se sabe el hongo *Beauveria bassiana* es hongo que ataca principalmente a la Mosquita Blanca (*Bemisia tabaci*), 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, es recomendable su uso sin temor a que dañe al ser humano.

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.

4.2. Identificación de *Beauveria*

Forma conidióforos simples e irregulares que terminan en vértice en forma de racimos, la célula conidiógena con la base globosa o abultada presentando un adelgazamiento en la parte superior formando un esterigma curvado en forma de zig.zag. Se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillo cremoso.

Hasta 1954 se habían descrito 14 especies de *Beauveria* y McLeod las redujo a dos *bassiana* y *tenella* y DeHoog incluyó a *B. tenella* en *B. brongniartii*.

4.3 Claves para estas especies:

Conidias globosas o subglobosas de 2-3 X 2.0 -2.5 µm, con conidióforos formados en racimos.....*B. bassiana*

Conidias elipsoides de 2 – 3 X – 1.5 – 2.5 µm, conidióforos escasos o raramente en racimos.....*B. brongniartii*.

En 1834 Agostino Bassi demostró por primera vez que una enfermedad en insectos era ocasionada por un hongo; de manera experimental confirmó la enfermedad “muscardina blanca” del gusano de seda *Bombix mori Linnaeus*, que en 1835 Balsamo Crivell describió y llamo al hongo *Botrytis bassiana* en honor a Bassi.

El género *Beauveria* es un entomopatógeno imperfecto de la clase de los Deuteromycetes, familia Monilaceae. Es un hongo cosmopolita que infecta a más de 700 especies de insectos, (Berlanga y Hernández, 1999b).

Es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas (Godoy *et al.*, 2007).

Sus hifas septadas contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre los cuales se desarrollan las conidias. Este ramifica sus micelios para formar conidióforos que son simples e irregulares los cuales

terminan en vértice en forma de racimos, la base de la célula conidiógena es globosa presentando un adelgazamiento en el área donde se insertan los conidios, los cuales son de 2 – 3 X 2.0 - 2.0 μm estos se insertan sobre esterigmas curvados en forma irregular o dispuestos en zig-zag. El hongo se caracteriza por presentar una apariencia polvosa, blanco algodonoso o amarillamiento cremoso (Berlanga y Hernández, 1999b) Los hospederos de este género son principalmente lepidópteros, Coleopteros, e Hymenopteros pero puede presentarse en Homópteros y Dípteros (Berlanga y Hernández, 1996b).

4.4 Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos

El hongo *Beauveria bassiana* pertenece a la clase Deuteromycotina, subclase Hyphomycetes y al orden Moniliales. Forma conidióforos simples e irregulares, que terminan en vértices en forma de racimos, la célula conidiógena con la base globosa o abultada presentando un adelgazamiento en la parte superior, formando un esterigma curvado en forma de zig-zag. Se caracteriza por presentar micelio blanco.

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

SUBDIVISION	CLASE	ORDEN	GÉNERO		
Mastigomicotina	Crytridiomycetes	Crytridiades	<i>Coelomicidium</i>		
			<i>Myiophagus</i>		
	Oomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomices</i>		
		Lagenidiales	<i>Lagenidium</i>		
		Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i>		
	Zygomycetes			<i>Couchia</i>	
			Mucorales	<i>Sporodiniella</i>	
			Entomophthorales	<i>Conidiobolus</i>	
				<i>Entomophaga</i>	
				<i>Entomophthora</i>	
<i>Erynia</i>					
<i>Massospora</i>					
Ascomycotina			Hemiascomycetes		<i>Meristacrum</i>
					<i>Neozygites</i>
					<i>Blastodendrion</i>
		<i>Metschnikowia</i>			
		<i>Mycoderma</i>			
		<i>Sacharomyces</i>			
	Plectomycete				
	Pyrenopmycetes				
Basidiomycotina		Endomycetales	<i>Aschosphaera</i>		
			<i>Cordyceps</i>		
			<i>Torrubiella</i>		
			<i>Nectria</i>		
			<i>Hypocrella</i>		
		Laboulbeniomycetes	<i>Calonectria</i>		
			<i>Filariomyces</i>		
			<i>Hesperomyces</i>		

	Loculoascomycetes	Ascospaerales Sphaeriales	<i>Trenomyces</i>
			<i>Myrangium</i> <i>Podonectria</i>
Deuteromycotina	Pharagmobasidiomycetes	Laboulbeniales	
			<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i> <i>Akanthomyces</i>
		Myrangiiales	
	Hypomycetes		
		Septobasidiales	<i>Akanthomyces</i> <i>Aspergillus</i>
			<i>Beauveria*</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Fusarium</i> <i>Guibellula</i> <i>Hirsutela*</i> <i>Hymenostible</i> <i>Metarhizium*</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces*</i> <i>Paraisaria</i> <i>Pleurodesmospora</i> <i>Ploycephalomyces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorosporella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Strilbella</i> <i>Tretranacrium</i> <i>Tilachlidium</i> <i>Tolypocladium</i>
		Moniliales	
	Coelomyces		
	Micelia-Steril		

*Verticillium**

*Aschersonia**

Aegerita

Sphaeropsidales

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).

4.5 Modo de Infección

A diferencia de las bacterias y virus, los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* pueden infectar insectos no solo a través del intestino, sino también por los espiráculos y particularmente en forma directa por penetración del

integumento. Esta propiedad es independientemente de los hábitos alimenticios del insecto.

En general, el desarrollo de *Beauveria bassiana* sobre los insectos incluye la adhesión de los conidios al insecto, la penetración del tubo germinativo al interior del cuerpo del insecto, estableciéndose y diseminándose, produciendo la muerte del insecto.

Beauveria bassiana ocasiona la muerte del insecto, así como alteraciones en su ciclo biológico, en disminución de la ovoposición y aumento a la sensibilidad de otros agentes de control. Si las condiciones de temperatura y humedad son favorables esporula en el exterior del insecto. De manera similar a otros hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* deshidrata y mata a los insectos que infecta si no hay condiciones favorables de humedad y temperatura para la esporulación.

4.6 Descripción del proceso de producción, Aislamiento e incremento del hongo

En la fase del aislamiento e incremento del hongo se persigue obtener una cantidad adecuada de inóculo que permita mantener una producción constante de conidios. Las actividades que se desarrollan en esta fase se deben realizar bajo condiciones totalmente asépticas. Para lo anterior toda la cristalería e instrumentalización requerida, así como el agua utilizada deberá ser estéril.

La esterilización se obtiene a través del paso por un autoclave en la cual las “condiciones de temperatura (121°C - 124°C) y presión (15 psi)” no permiten la persistencia de microorganismos que puedan ser fuente de contaminación. El material a esterilizar debe “mantenerse en la autoclave por un tiempo que oscila entre 20 y 25 minutos”. Las actividades en esta fase son:

a. Revigorización y aislamiento

b. Prematrices

c. Matrices

Prematrices

Las prematrices son una fase opcional de incremento del hongo. Una prematriz consiste en un tubo de ensayo con rosca en el cual se ha colocado medio de cultivo (preferiblemente aba). De una colonia se pueden preparar de 20 a 30 prematrices. Para el efecto, bajo condiciones de asepsia y con el equipo e instrumentos estériles, se corta la colonia proveniente del aislamiento con un bisturí y se colocan los trozos de medio de cultivo y conidios en el interior de “un tubo de ensayo que contenga agua estéril y surfactante al 0.01%” (Ref. 3, pág. 18). A través de agitación manual se suspenden los conidios en el agua y se separan del medio de cultivo con la ayuda de un filtro (puede ser de gasa estéril). La suspensión deberá contener una cantidad superior a 1E8 conidios por ml. “Se agregan 2 ml. de la suspensión en cada prematriz deseada” (Ref. 4 pág. 26). Se dispersa sobre el medio y se elimina el exceso de la suspensión. El período y las condiciones de incubación son similares a las descritas para el aislamiento de

colonias, con la diferencia que no se sella el tubo de ensayo, dejando ligeramente floja la tapa. La incubación del hongo se realiza con los tubos (prematrices) colocados en forma horizontal. Al final se obtienen medios totalmente colonizados con los conidios del hongo. Las pre-matrices pueden utilizarse inmediatamente, en caso contrario deben “almacenarse en un ambiente con la temperatura inferior a los 6°C” (Ref. 3 pág. 26). A las pre-matrices que se almacenan se les aprieta la tapa y se sellan con papel para-film.

V METODOLOGÍA

5.1 Preparación de Matrices

Se preparó medio de cultivo PDA (Papa, Dextrosa, Agar) en 400 ml. de agua destilada con 26 gr. de PDA en un matraz de 1L (figura No. 1 y No. 2), se cocina en un DIRT (Parrilla Digital) a una temperatura de 250°C durante 15 minutos (figura No. 3). Se vertió 10 ml de Agar en 20 tubos de ensayo y 20 ml en 10 cajas Petri, los tubos de ensayo se colocan en unos vasos precipitados y las cajas Petri se embolsan y se colocan en unas canastas metálicas que se introducen en el auto clave para ser esterilizados (figura No. 4). Después del tiempo transcurrido de la esterilización se sacan y se ponen a enfriar y a solidificar de forma horizontal con una leve inclinación; para continuar con la siembra de hongo *Beauveria bassiana* en matrices (figura No. 5).



FIGURA NO. 1 PESANDO EL AGAR.



FIGURA NO. 2 AUTOCLAVE MARCA FELISA.



FIGURA NO. 3 DEPOSITANDO EL AGAR EN MATRAZ



FIGURA NO. 4 COCINANDO EL AGAR.



Figura No. 5 enfriando el agar.

5.2 Sembrado de Matrices

Se esterilizo todo el lugar así como la cámara de flujo laminar con abundante cloro al 5% y alcohol absoluto, para una mejor esterilización se utilizó una torunda de algodón y alcohol encendido como se muestra en la figura No. 6. Se preparó el asa platino, se prepararon los mecheros para mantener un ambiente más estéril. Se tomó la cepa del hongo *Beauveria bassiana*, donada por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVEQROO) figura No 7.



Figura No. 6 Esterilizando la campana



Figura No. 7 Cepa de CESAVEQROO



Figura No.8 Sembrando en tubos de ensayo.



Figura No. 9 Esterilizando el aza.

Inmediatamente se realizó la siembra en los tubos de ensayo y en las cajas de Petri, utilizando un aza, 2 mecheros y un tubo con agua esterilizada y antibiótico para evitar que el aza se contamine, se introduce el aza en la Beauveria bassiana aislada e inmediatamente se introduce al tubo y en forma de zigzag se deposita en el medio de cultivo, se retira el aza y se introduce en el antibiótico para que no quede expuesta al medio ambiente e inmediatamente se le pone su tapón al tubo de ensayo y así sucesivamente hasta sembrar todos los tubos figura No.8, 9 y 10 y al terminar; se siembra en las cajas de Petri de la misma forma e inmediatamente se sellan con cinta de parafilm figuras No.11,12 y 13 y se ponen en un área de incubación con la luz y la temperatura adecuada para su pronta reproducción figura No 14.



Figura No.10 Sembrando en tubo.



Figura No. 11 tomando el hongo con el aza.



Figura No. 12 Sembrando en caja de Petri.



Figura No. 13 Sellando la caja de petri



Figura No.14 Material ya sembrado.

Después de tres semanas obtenemos las nuevas sepas de *Beauveria bassiana* producidas en el laboratorio entomológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya figuras No.15 y 16. Después de observar que tienen una buena esporulación y se desprende como talco al agitarla ligeramente. Estas mismas se llevan al refrigerador para conservar su viabilidad y utilizarlas posteriormente para inocular en el arroz para su producción masiva figuras No. 17, 18 y 19.



Figura No. 15 Hongo desarrollado



Figura No. 16 Hongo en matriz



Figura No. 17 Matrices al refrigerador.



Figura No. 18 cajas de Petri almacenadas.



Figura No. 19 Cepas en el refrigerador.

5.3 Preparación de material y equipo de laboratorio para sembrar hongo *Beauveria bassiana* en arroz.

5.4 Preparado de Arroz

Se preparó 10 litros de agua destilada con 5ml de antibiótico (enrofloxacina al 10%) y 2.5 ml. de cloro para lavar el arroz el cual se inoculará con el hongo *Beauveria Bassiana*, se pone el arroz dentro de una malla cernidor y posteriormente se mete dentro de una tina de plástico con el agua antes mencionada se agita para lavarle el almidón y se deja escurrir durante 12-15 minutos figuras No.20 y 21. Seguidamente se embolsan 200 gr de arroz por bolsa y se amarran con muy poco aire figura No.22; para luego esterilizarlas en el autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121°C, después del tiempo transcurrido y de que el autoclave se halla despresurizado, se retira el arroz el cual cuenta de un 4% a 6% de humedad y enseguida se lleva en una mesa de metal cubierta de papel estroza y ahí se depositan para que alcance una temperatura ambiente para posteriormente inocularlas con el hongo *Beauveria bassiana*.



Figura No. 20 Lavado de arroz.



Figura No. 21 Escurriendo el arroz.



Figura No. 22 Embolsando el arroz.

5.5 Inoculación de las bolsas con arroz

Se preparó en un matraz de 1000 ml; 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 posteriormente se le puso un tapón de algodón y se cubrió con papel aluminio y cinta masckin tape, Después se preparó las mangueras y el tapón del matraz y todo se puso a esterilizar en el autoclave (felissa) para su uso posterior. Después de la esterilización y de que el material tomo una temperatura ambiente; se llevó al área de siembra previamente esterilizada con cloro, alcohol y fuego; ya en la campana de flujo laminar Y estando esterilizado y frío el material, se procedió con la homogenización de una matriz de hongo *Beauveria bassiana* con clave (BTJS-181113 JMLV), con 10 ml del agua con antibiótico y dispersante anteriormente esterilizada, de forma constante la entrada del tubo se pasa por el fuego del mechero para evitar la contaminación interna del mismo, para esto se vierte el agua de uno de los tubos (10ml) en la matriz, y después de lograr la

homogenización se deposita en el matraz con el resto del agua, se colocó la manguera a la pistola figura No. 23, previamente esterilizada para luego inyectar las bolsas, con un total de 20 ml para cada bolsa (2 inyecciones), inmediatamente se sella el orificio de entrada con cinta adhesiva figuras No.24 y 25, y se mueven las bolsas para distribuir homogéneamente el inóculo y tenga un buen desarrollo el hongo *Beauveria bassiana*, figura No.26.



Figura No. 23 Inoculando el arroz.



Figura No. 24 Armando el equipo.



Figura No. 25 inyectando *beauveria b.*



Figura No. 26. Homogenizando el arroz.

5.6 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 y será removido el arroz cada 96 horas para romper el micelio en 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 del hongo *Beauveria bassiana* en producción.



Figura No. 27 En incubación.

5.7 Cosecha del Hongo (*Beauveria bassiana*)

Esta actividad se realiza en una tina de plástico con una malla-cernidor; poniendo una bolsa de 200gr. de arroz con hongo(Bb) con 20 gr de diatomita siendo esta un antihumectante; después de cosechar todo el hongo se deposita en una charola y se extiende para que seque y posteriormente se embolsa y se guarda en el refrigerador.



Figura No. 28 Cosecha del hongo *Beauveria bassiana*.

VI RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, en la producción del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* son óptimos debido a que se logró reducir la contaminación al mínimo, esto es en un 2%, en las matrices que se sembraron con aza, tubos de ensayo y cajas de Petri y de esta forma se lograron obtener cepas sanas para nuestro instituto. Al hacer la siembra en las bolsas de arroz para la producción masiva de las esporas del hongo *Beauveria bassiana* se logró reducir la contaminación en un 100% debido a que no hubo contaminación.

En la producción del hongo se logra observar que, debido a las medidas de higiene exigidas para entrar al laboratorio, se logró reducir la contaminación del ambiente interno y con esto demostrar que en el instituto también se puede llevar a cabo la producción del hongo *Beauveria bassiana*. El cual se puede lograr a bajo costo, y

al mismo tiempo es benéfico para el medio ambiente al reducir el uso de insecticidas químicos o totalmente desplazarlos por este bioinsecticida que favorecería el aspecto económico de los productores en sus cultivos, al adquirirlo a bajo costo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

VII CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

La buena y sana producción del hongo bioinsecticida *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, ha superado ampliamente muchas expectativas en la contaminación del medio sólido de producción (arroz); al lograr que el 100% de la producción esté libre de algún otro hongo que sea de nuestro interés. Este bioinsecticida se produce a bajo costo motivo por el cual los productores lo pueden adquirir de forma económica, siendo esto un beneficio en su sistema productivo, al reducir costos y contaminación en sus productos y al medio ambiente.

Es recomendable y muy necesario ser más estrictos en la higiene para tener una excelente bioseguridad al entrar a trabajar al laboratorio del instituto y de esta manera evitar la contaminación de las cepas de *Beauveria bassiana* producidas en el mismo y que este alcance un buen reconocimiento al producir cepas de alta calidad y por su excelente y estricta bioseguridad ahí implementada.

VIII.- GLOSARIO

CONIDIO.- (Conidium pl. Conidia) también se le llama conidiospora; espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio, como sucede con las esporangiosporas. Los conidios son las estructuras asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes y se pueden generar de novo (la mayoría) a partir de células hifales preexistentes.

ESPORA.- pequeña unidad de propagación unicelular o pluricelular asexual o sexual móvil o inmóvil que funciona como una semilla aunque difiere de esta última porque una espora no contiene embrión preformado.

HIFA.- filamento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos puede ser septado o cenocítico

HONGO.- organismo eucariótico acrorófilo, heterotrófico, y casi siempre el productor de esporas su talo varía de ameboide o plasmodial a unicelular o filamentoso

IX.- BIBLIOGRAFIA

Páginas de la web.

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. [en línea] 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 Metarhizum anisopliae.* Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 1984 n° 1. México: enero 1984. 497 p.

X.- ANEXOS

10.1 Dilución seriada:

Consiste en colocar el insecto esporulado en un recipiente con agua destilada estéril y dispersante, la suspensión resultante se debe agitar por 1 min, como resultado se obtiene una suspensión concentrada del inoculo y otras partículas; esta suspensión es la solución madre. A partir de esta solución se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). La primera dilución (10^{-1}) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril mas 0,01 % de Twwen 80, éste se agita fuertemente durante 1 min. Luego se coloca 1ml de esta suspensión en otro tubo de ensayo con 9ml de agua destilada estéril mas 0,01 % de Twwen 80, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr una serie de diluciones (10^{-1} hasta 10^{-6}). Para realizar la siembra y obtener los cultivos del hongo se deben usar las últimas diluciones.

10.2 Preparación de medio de cultivo

a) Papa dextrosa agar (PDA)

- Papa sin pelar 200 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1 litro

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

b) Sabouraud

- Dextrosa 20 g
- Peptona 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1000 ml

Se pueden utilizar antibióticos como Penicilina + Estreptomicina (30 – 50ppm) que deben agregarse a los medios de cultivo después de ser esterilizados en autoclave y enfriarlos a una temperatura menor a 60 °C

10.3 Técnica de conservación por sílica gel.

1. Esterilizar en autoclave los tubos de vidrio con tapa rosca de 4 ml de capacidad, con la respectiva identificación incluida dentro del tubo.

2. Colocar sílica gel (6 – 22 mesh, sin indicador) en tres cuartas partes del tubo de vidrio y esterilizar con aire caliente en un horno a 180 °C durante 3 horas.
3. Mantener los tubos en congelación hasta su uso.
4. A un tubo de vidrio conteniendo medio PDA y el hongo en crecimiento, agregar 3 ml de agua destilada estéril.
5. Con la ayuda de un ansa de siembra, retirar todo el desarrollo miceliano del hongo y luego agitarlo en el vortex durante 15 segundos.
6. En una cámara de flujo laminar, utilizando una micropipeta, agregar 500 µl de la suspensión de conidias al tubo con sílica gel, previamente identificado.
7. Poner los tubos con inóculo y sellados con parafilm® en una incubadora a 20 °C por 15 días.
8. Luego de ese lapso, colocar los tubos a 4 °C por el tiempo que se quiera almacenar.

Para la reactivación de los hongos:

1. Tomar unos cuantos cristales de sílica gel, en un ambiente estéril y colocarlos sobre medio de cultivo.
2. Sellar la placa, colocarla a 20 °C y esperar su desarrollo

7.4 Técnica de liofilización

El proceso es el siguiente:

1. Esterilizar en autoclave tubos con tapa rosca, previamente identificados y con 0.25 cm² de algodón.
2. Al tubo con el medio de cultivo y colonia, agregar 2 ml de una suspensión crioprotectora a base de glucosa y gelatina.

Preparación:

Un litro de agua destilada con 6 gramos de glucosa.

Un litro de agua destilada con 6 gramos de agar.

Se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.

3. Añadir al tubo 1 ml de cada preparación.
4. Con un ansa de siembra separar el cultivo del medio.
5. Añadir 200 µl de la suspensión de hongos en el tubo estéril.
6. Cerrar los tubos y llevarlos a - 80 °C de 10 a 15 minutos y luego liofilizarlos por 48 horas.
7. Retirar los tubos del liofilizador, cerrarlos bien y sellarlos con Parafilm y mantenerlos a 4 °C.

Para la reactivación de los hongos:

1. Abrir el tubo, bajo un ambiente estéril, añadir 1 ml de agua estéril y dejar reposar durante 30 minutos (rehidratación).
2. Tomar una pequeña cantidad de la suspensión y sembrarla en placas de petri con medio de cultivo.

Es conveniente realizar la reactivación de la cepa almacenada antes de empezar a trabajar con cualquier método, pasándola por un insecto hospedante con la finalidad de comprobar su viabilidad y pureza