

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

**EVALUACION DE SIETE SUSTRATOS PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL
ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Ness).**

POR
MARLON ESTUARDO DAVILA DE LEON

Guatemala, Octubre de 2002.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**EVALUACION DE SIETE SUSTRATOS PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL
ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Ness).**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTA DE AGRONOMIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

MARLON ESTUARDO DAVILA DE LEON

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE LICENCIADO

Guatemala, Octubre de 2002.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. M.V. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. EDGAR OSWALDO FRANCO RIVERA
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MANUEL DE JESUS MARTINEZ OVALLE
VOCAL CUARTO	Br. WENER ARMANDO OCHOA OROZCO
VOCAL QUINTO	Br. AXEL AURELIANO HERRERA PEREZ
SECRETARIO	Ing. Agr. EDIL RENE RODRIGUEZ QUEZADA

Guatemala, Octubre de 2002.

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**EVALUACION DE SIETE SUSTRATOS PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL
ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Ness)**

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

En espera que la presente investigación llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente,

Marlon Estuardo Dávila de León

ACTO QUE DEDICO

A:

- DIOS:** Por permitirme que esté conociendo la verdad, porque a través de ella sabré más a cerca del amor.
- MIS PADRES:** Adán Hipólito Dávila Lemus
Lidia de León Avila
Como una muestra de amor, nunca olvidaré este bello momento que me han regalado. Los quiero.
- LA MEMORIA DE MI HERMANO:** Daniel (**CHITO**), gracias por todos los momentos compartidos y por que siempre serás mi confidente. Dichoso por que has conocido el mayor misterio de los humanos.
- MI ESPOSA:** Fabiola, por ser esa fuente de luz que me ilumina todos los días, por ser esa hermosa flor que le da belleza y aroma a mi vida y por ser ese alguien que me ha brindado su hombro para apoyarme en los momentos difíciles. Te amo. Tu tienes algo que yo no tengo.
- MI SOBRINO:** Anthony Daniel, con mucho amor y espero que esto te pueda servir como incentivo para seguir siempre adelante.
- MIS ABUELOS (AS):** Carmela Avila, María Lemus y Eliseo Dávila (papá Cheyo), por por regalarme su experiencia y sus sabios consejos.
- MIS SUEGROS:** José García y Amelia Axt, con un cariño tan especial.
- MIS CUÑADOS (AS):** Adilia, Odeth y Arturo, porque los quiero mucho.
- MIS TIOS (AS):** A todos y todas, pero en especial a:
Odilanda, Nery y Abdul, gracias por el cariño que siempre me han brindado.
- MIS PRIMOS (AS):** A todos y a todas, pero en especial a:
Ivan, Jessica, Luis Daniel y José (colochó), porque son como mis hermanos.
- MIS AMIGOS Y DE SIEMPRE:** Ana Lourdes, Mariela Valdés, Doris de Salaverría, Jackeline Salaverría, Saida, Claudia Toledo, Anamar Sánchez, Elda Vásquez, Glenda Quan, Adela, Ericka, Vicky, Katy, Sayuri Jui, Gilben, Esdras, Ery Melgar, Filiberto Salvatierra, Jorge Pablo Versluys, Honder Martínez, Hugo, René Orellana, Wuenseslao Roblero, Filiberto, Urbano de León, Walter y Nelson Bámaca, Benito, Rubén, Antonio Pineda, Henry España, Luis Segura (mono), Carlos M. García, Juan Herrera, Oscar Mont, Rolando Godínez Rony Castillo, Fernando Hurtado, Fredy Barrios, Allan Scott, Leonel Alvarez, Marvín Xia, Edgar Jacinto, Iván Roca, Jacobo Bolvito, José D. Mendoza, Mario Ruiz (Fidel Castro), Elmer Navarro, Anibal Aguirre, Byron González, Germany, Lauro Portillo, Gerardo Navarro, Dr. Carlos González, Ricardo Rivera, Julio Perez, y Alex Diaz, con un gran aprecio. Gracias por regalarme su amistad.

AGRADECIMIENTO

A:

Mis asesores Ing. Agr. M.Sc. Filadelfo Guevara e Ing. Agr. José Domingo Mendoza, por su asesoría en la realización del presente trabajo, así mismo por esa amistad incondicional.

Mis padrinos Licda. Química Farmacéutica Mariela Valdés e Ing. Agr. Gilben Escobar, por compartir conmigo esta alegría indescriptible.

El Ing. Agr. Ronald Estrada (pionero del control biológico en Guatemala) por apoyarme y regalarme esa inmensidad de conocimientos.

Los señores del Centro de Documentación e información Agrícola (CEDIA):

Ing. Agr. Rolando Aragón, Br. Marco Antonio Fausto (Don maco) y Br. Henry Danilo Dardón.
Muchas gracias por ese gran apoyo que me brindaron en todo momento.

Las familias:

García Mazariegos: Arturo, Mónica, María José y Axel Arturo.

Yela Molina: Doña Soila y Ana Lourdes

Rivera Valladares: En especial a Doña Esperancita

Salaverria corzantes: Dr. Antonio Salaverría, Doris de Salaverría y Jackeline

Mil gracias por abrirme las puertas de sus hogares. Que Dios los bendiga.

TESIS QUE DEDICO

A:

Mi patria Guatemala

San Marcos y a ese pequeño terruño que me vio crecer “El Rosario”

La Tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala

La Cincuentenaria Facultad de Agronomía

Instituto Normal Mixto de Occidente (INMO)

Escuela de Formación Agrícola de San Marcos (EFA)

Escuela José Antonio de León Bonilla

Mis catedráticos en general

INDICE

	Pag.
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE CUADROS	ii
1. INTRODUCCION	1
2. JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1. MARCO CONCEPTUAL	4
3.1.1. Control biológico	4
3.1.1.1. El control microbiológico	4
3.1.2. Patogenicidad y virulencia	5
3.1.2.1. Patogenicidad	5
3.1.2.2. Virulencia	5
3.1.3. Hongos entomopatógenos	5
3.1.4. Características de hongos entomopatógenos	7
3.1.4.1. Entomophthorales	7
3.1.4.2. Blastocladales	7
3.1.4.3. Cordyceps	7
3.1.4.4. Muscardina	8
3.1.4.5. Otras micosis	8
3.1.5. Desarrollo de la enfermedad causada por hongos entomopatógenos	8
3.1.5.1. Unión de unidad infectiva a la epicutícula	9
3.1.5.2. Germinación	10
3.1.5.3. Formación de Apresorios	10
3.1.5.4. Formación de estaquilla de penetración	10
3.1.5.5. Penetración	10
3.1.5.6. Multiplicación del hongo en el hemocele	11
3.1.5.7. Producción de toxinas	11
3.1.5.8. Muerte del insecto	12
3.1.5.9. Colonización total	13
3.1.5.10. Emergencia del hongo hacia el exterior	13
3.1.5.11. Esporulación	13
3.1.5.12. Diseminación	13

3.1.6. Producción de hongos entomopatógenos	14
3.1.6.1. Antecedentes	14
3.1.6.2. Métodos de producción	15
3.1.6.3. Formas de producción	15
3.1.6.4. Sustratos	16
3.1.6.5. Proceso de producción	20
3.1.6.6. Contaminantes de los sustratos	23
3.1.6.7. Control de calidad	25
3.1.6.8. Preparación del hongo para la aplicación	26
3.1.7. Tasa Marginal de Retorno	26
3.1.7.1. Análisis Marginal	26
3.1.7.2. Presupuesto Parcial	27
3.1.7.3. Análisis de Dominancia	27
3.1.7.4. Tasa Marginal de Retorno (TMR)	27
3.2. MARCO REFERENCIAL	29
3.2.1. Entomopatógeno: <i>Verticillium lecanii</i> (Ness)	29
3.2.1.1. Generalidades	29
3.2.1.2. Taxonomía	30
3.2.1.3. Efecto de la humedad y temperatura	30
3.2.1.4. Ciclo biológico	30
3.2.1.5. Dispersión de esporas e infección	32
3.2.1.6. Producción y almacenamiento	32
3.2.1.7. Seguridad del hombre y otros animales	32
3.2.1.8. Estudios realizados con <i>V. Lecanii</i>	32
3.2.2. Sustratos utilizados	33
3.2.2.1. Arroz	33
3.2.2.2. Maíz	34
3.2.2.3. Coco	35
3.2.2.4. Maní	35
4. OBJETIVOS	37
5. HIPÓTESIS	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1. Localización del experimento	39
6.2. Tratamientos	39
6.3. Tamaño de la unidad experimental	40

6.4. Diseño experimental	40
6.5. Manejo del experimento	41
6.5.1. Reproducción de esporas de inóculo	41
6.5.2. Preparación de los sustratos	42
6.5.3. Determinación de la concentración de esporas	43
6.5.4. Siembra de esporas en los sustratos (Inoculación)	44
6.5.5. Secado de los sustratos	44
6.5.6. Evaluación de los sustratos	44
6.6. Variables de respuesta	45
6.6.1. Porcentaje de viabilidad del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> de cada uno de los sustratos	45
6.6.2. Concentración de esporas del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> de cada uno de los Sustratos	45
6.8. Análisis de la información	45
6.8.1. Modelo estadístico	45
6.8.2. Análisis de varianza	46
6.8.3. Prueba de Medias	46
6.8.4. Análisis Económico	46
7. RESULTADOS Y DISCUSION	47
7.1. Porcentaje de viabilidad del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> de cada uno de los sustratos	47
7.2. Concentración de esporas del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> de cada uno de los sustratos	50
7.3. Análisis económico	52
8. CONCLUSIONES	55
9. RECOMENDACIONES	56
10. BIBLIOGRAFIA	57
11. APENDICE	60

INDICE DE FIGURAS

i

pag.

Figura 1. Ciclo de infección de un hongo entomopatógeno	9
Figura 2. Entomopatógeno <i>Verticillium lecanii</i> (Ness)	29
Figura 3. Forma y tamaño de la unidad experimental	40
Figura 4. Distribución de los tratamientos sometidos a evaluación en la sala de crecimiento	41
Figura 5. Porcentaje de esporas viables del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness) producidos por cada sustrato evaluado	49
Figura 6. Concentración de esporas del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness) producidas por cada sustrato evaluado	52
Figura 7. Sustrato arroz conteniendo <i>V. lecanii</i> (Ness)	62
Figura 8. Esporas de <i>V. lecanii</i> (Ness)	62
Figura 9. Micelio y esporas <i>V. lecanii</i> (Ness)	63

INDICE DE CUADROS

ii

Pag.

Cuadro 1.	Toxinas producidas por los principales hongos entomopatógenos	12
Cuadro 2.	Análisis proximal de los sustratos evaluados	36
Cuadro 3.	Tratamientos evaluados para la reproducción del entomopatógeno <i>Verticillium lecanii</i> (Ness)	39
Cuadro 4.	Promedio de los resultados obtenidos de la variable viabilidad de esporas producidas	47
Cuadro 5.	Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de esporas del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	48
Cuadro 6.	Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	48
Cuadro 7.	Promedio de los resultados obtenidos de la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	50
Cuadro 8.	Análisis de varianza para la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	51
Cuadro 9.	Prueba de Tukey para la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	51
Cuadro 10.	Análisis del presupuesto parcial de los tratamientos evaluados	53
Cuadro 11.	Análisis de dominancia para cada tratamiento evaluado	54
Cuadro 12.	Tasa Marginal de Retorno para las condiciones no dominadas respecto a los sustratos utilizados para la reproducción del hongo entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness)	54
Cuadro 13A.	Porcentaje de viabilidad de esporas del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness) en los sustratos evaluados	60
Cuadro 14A.	Concentración de esporas del entomopatógeno <i>V. lecanii</i> (Ness) en los sustratos evaluados	61

RESUMEN

EVALUACION DE SIETE SUSTRATOS PARA LA REPRODUCCION MASIVA DEL ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Ness)

SUMMARY

EVALUATION OF SEVEN SUSTRATES FOR THE MASSIVE REPRODUCTION OF THE ENTOMOPATOGENOUS *Verticillium lecanii* (Ness)

El presente estudio se realizó con el propósito de evaluar el efecto de siete sustratos sobre la cantidad y calidad de esporas producidas por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness), utilizando para ello los siguientes productos no elaborados: Arroz (Testigo) (*Oriza sativa* L.), Maní (manía, cacahuete) (*Arachis hipogaea* L.), Albumen de coco (carnaza, copra) (*Cocus nucifera* L.), Maíz blanco molido (*Zea mays* L.), y las combinaciones Maíz blanco molido + albumen de coco, Manía + albumen de coco y Maíz blanco molido + maní; con la finalidad de buscar alternativas más viables y económicas, así mismo para aportar más información sobre el hongo, ya que en Guatemala se cuentan con pocos conocimientos al respecto.

La investigación se realizó en el laboratorio de la empresa Agrícola El Sol S.A., que se encuentra ubicado en la 30 calle 11-42 zona 12, ciudad de Guatemala. El mismo se encuentra implementado con las instalaciones, equipo, condiciones de luz, temperatura, humedad y aislamientos adecuados para la reproducción de organismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos y nemátodos).

Se utilizó el diseño completamente al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones. Las variables de respuesta evaluadas fueron: Porcentaje de viabilidad y concentración de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* de cada uno de los sustratos.

Los resultados indican que la viabilidad del hongo entomopatógeno *V. lecanii* se favoreció con la utilización de los sustratos Arroz (Testigo), Maíz blanco molido + albumen de coco, Albumen de coco, Maní + albumen de coco y Maní + maíz blanco molido; ya que presentaron una alta viabilidad de esporas, teniendo un rango entre 86 y 92%, lo cual indica una alta probabilidad de mantenerse viables durante el período de almacenamiento. Estadísticamente los siete sustratos permitieron el crecimiento, desarrollo y esporulación del entomopatógeno, pero siendo el sustrato Maíz blanco molido + albumen de coco el que produjo la mayor concentración de esporas (1.57221×10^{17}).

Los sustratos Maíz blanco molido y Maní, sin mezcla, fueron los que presentaron la mas baja viabilidad y concentración de esporas.

Económicamente puede utilizarse el sustrato Arroz, como medio para la reproducción de *V. lecanii*, ya que posee una Tasa Marginal de Retorno de 1168%.

1. INTRODUCCION

El uso excesivo de plaguicidas provoca efectos negativos en el suelo, el agua y el ambiente. Además han contribuido a aumentar los problemas de plagas debido al desarrollo de resistencia y a la destrucción de los enemigos naturales. Ciertos plaguicidas afectan la salud de las personas, produciendo cáncer, aún al ser ingeridos en pequeñas cantidades (19, 23).

Por lo anterior, se ha emprendido la búsqueda de alternativas para reducir estos efectos. Una de estas alternativas es el uso de organismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos y nemátodos) los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de insectos sin pretender su exterminio y además tienen la ventaja de que son selectivos, no atacan insectos benéficos para la agricultura y no son nocivos para los seres humanos. En Guatemala el uso de organismos entomopatógenos se inició hace 28 años, cuando el algodón era un cultivo extensivo y las plagas que lo afectaban desarrollaron resistencia a los plaguicidas, llegándose a realizar hasta 45 aplicaciones, teniendo como resultado una baja rentabilidad en el cultivo (19).

Actualmente, se han identificado y estudiado diversas especies de hongos entomopatógenos, ya que son los organismos con mayor potencial para el control de plagas de insectos, obteniéndose respuestas a corto plazo. Debido al interés que han suscitado los hongos entomopatógenos como controladores de plagas, algunos son reproducidos masivamente en medios nutritivos (sustratos) tales como arroz, maíz, papa, granos de cereales, harina de soya o algodón, etc., considerando que son de fácil preparación, bajo costo y que a la vez permiten un buen crecimiento y esporulación del entomopatógeno sin que éste pierda su viabilidad y virulencia durante el almacenamiento (22).

El hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness) perteneciente a la clase Deuteromycetes, se encuentra frecuentemente atacando áfidos (Hom.: Aphididae) y escamas (Hom.: Coccoidae), en las zonas tropicales y subtropicales. Además ha sido encontrado sobre insectos de los órdenes Coleóptera, Homóptera, Díptera, Hymenóptera y sobre ácaros. Los insectos infectados por este hongo tienen una apariencia blanquecina (23).

V. lecanii es un hongo que requiere de gran cantidad de proteínas para su desarrollo, a nivel de laboratorio se ha utilizado el medio de cultivo Agar sabouraud con extracto de levadura, con la desventaja de tener un alto costo y presentar dificultad para su preparación ya que requiere de instalaciones y equipos especiales. Con el propósito de buscar alternativas más viables y económicas para producir *V. lecanii* sin atentar contra su calidad (concentración y viabilidad), se realizó esta investigación tendiente a

verificar la calidad y cantidad de esporas del hongo producidas utilizando siete sustratos: Arroz (Testigo) (*Oriza sativa* L.), Maní (manía, cacahuete) (*Arachis hipogaea* L.), Albumen de coco (carnaza, copra) (*Cocus nucifera* L.), Maíz blanco molido (*Zea mays* L.), y las combinaciones Maíz blanco molido + albumen de coco, Manía + albumen de coco y Maíz blanco molido + maní.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que todos los sustratos produjeron esporas, pero el sustrato maíz blanco molido + albumen de coco fue el que presentó la mayor concentración de esporas (1.57221×10^{17}), así mismo los sustratos Arroz (Testigo), Maíz blanco molido + albumen de coco, Albumen de coco, Maní + albumen de coco y Maní + maíz blanco molido favorecieron la viabilidad de las esporas del hongo con un rango entre 86 y 92%.

Económicamente y con fines de producción masiva para la comercialización del entomopatógeno se recomienda utilizar el sustrato Arroz (Testigo) ya que con el mismo se obtuvo una Tasa Marginal de Retorno de 1,168 %.

2. JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

Los hongos son el segundo grupo de organismos más grande del mundo después de los insectos. Su importancia radica en que participan en todos los procesos biológicos, teniendo un papel vital en la evolución de la vida terrestre, en la dinámica de los ecosistemas, el mantenimiento de la biodiversidad y el progreso humano (25).

Desde hace más de un siglo Pasteur ya había pronosticado un grupo interesante de hongos: Los entomopatógenos, que tenían como papel principal “actuar como biorreguladores naturales de las plagas al parasitar insectos dañinos (22).

El estudio de los entomopatógenos potencialmente útiles para el control biológico de plagas agrícolas, plantea la perspectiva de limitar el uso de los plaguicidas químicos y así atenuar sus efectos adversos como contaminantes del ambiente, favoreciendo de esta manera el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas terrestres y la conservación de los recursos naturales.

En el campo de los hongos entomopatógenos se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies, algunos de los cuales han sido utilizados exitosamente en programas de control biológico. Actualmente estos entomopatógenos son reproducidos masivamente y vendidos comercialmente (25).

Para la producción de hongos entomopatógenos se han empleado muchos productos no elaborados tales como arroz que es utilizado como sustrato de crecimiento para *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*; maíz quebrado para producir *Metarhizium anisopliae*; copra de coco para producir *Beauveria bassiana*; sorgo y trigo para producir *Spicaria sp.*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; papa y camote para producir masivamente *Aschersonia sp.*, entre otros, obteniéndose resultados satisfactorios (3, 18, 21, 24, 26).

Con base en estos datos y con el propósito de buscar alternativas más viables y económicas para producir *Verticillium lecanii* (Ness), se realizó esta investigación que pretende aportar información sobre el crecimiento, desarrollo y producción de esporas de este hongo en los sustratos, ya que en Guatemala se cuentan con pocos conocimientos al respecto.

3. MARCO TEORICO

3.1. MARCO CONCEPTUAL

3.1.1. CONTROL BIOLOGICO

El control biológico se ha definido como una fase de control natural en la que mediante la acción de parasitoides, depredadores o entomopatógenos, se mantiene la densidad poblacional de otro organismo a un promedio más bajo que el que existía en su ausencia. En esta definición se indica que el objetivo del control biológico no persigue la eliminación completa de los organismos dañinos, sino más bien la reducción o la limitación de su densidad poblacional por debajo de umbrales de daño económico. Hay que hacer resaltar que el control biológico se vale únicamente de organismos vivos para sus propósitos (3).

Al control biológico le corresponde abarcar métodos por medio de los cuales se aumenta la resistencia de las plantas contra el daño ocasionado por factores bióticos y abióticos (3).

3.1.1.1. El control microbiológico

El control microbiológico de las plagas es parte del control biológico. En este se utilizan los microorganismos entomopatógenos como agentes de control de las plagas agrícolas. Las plagas también sufren enfermedades, las cuales pueden ser causadas por nemátodos, hongos, bacterias, protozoos y virus, aunque los conocimientos más generalizados se tienen en torno a los hongos entomopatógenos, que se reportan desde 1836. La rama de la ciencia que estudia las enfermedades se llama patología y en el caso de los insectos se llama entomopatología (13).

Muchos hongos, bacterias y virus causan enfermedades que debilitan a una gran cantidad de plagas que atacan a los cultivos. Este tipo de patógenos beneficiosos ofrecen algunas veces un control extraordinario sin intervención del hombre. Sin embargo éste tipo de epidemias no ocurre en forma tal que ya no haya que preocuparse más por las plagas, hay que ayudar a la naturaleza a producir patógenos en forma masiva para controlar una plaga determinada (3).

Algunos patógenos causan enfermedades en los insectos, que los debilitan y hacen más susceptibles a otros factores de mortalidad (3).

La utilización de patógenos para el control de insectos depende de la biología y características tanto de los insectos huéspedes, y de los microorganismos patógenos; así como, del ambiente. Así mismo, las poblaciones grandes de insectos son más susceptibles a las epizootias que las que presentan bajas densidades de población (3).

3.1.2. PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

3.1.2.1. Patogenicidad

Es la capacidad relativa de un microorganismo para vencer las defensas corporales del huésped (13).

3.1.2.2. Virulencia

Es la capacidad para ocasionar enfermedad (reacción mórbida del huésped). Es una cualidad fija inherente al microorganismo en relación con cada huésped potencial que se considere (13).

3.1.3. HONGOS ENTOMOPATOGENOS

Las primeras especies entomopatógenas fueron Ascomicetos pertenecientes al género *Cordyceps*. La mayoría de los estudios han sido confinados a ciertos hongos encontrados en escamas (Hom.: Coccoidae) y mosquitas blancas (Hom.: Aleyrodidae), los llamados hongos muscardinos blancos y verdes y unos pocos de *entomophthorales* (3).

Las infecciones fúngicas son muy comunes en insectos y relativamente fáciles de detectar debido a que generalmente los cuerpos de los hospederos aparecen cubiertos con micelio o cuerpos fructíferos del hongo. Hasta el momento se han registrado 40 géneros de hongos entomopatógenos, sin embargo, solo unos pocos se han investigado intensivamente con el fin de usarlos en programas de control microbial. Los géneros de hongos más estudiados corresponden a: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Coelomomyces*, *Cordyceps*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Hirsutella* (3, 12).

Los hongos entomopatógenos son organismos heterótrofos (falta de fotosíntesis) que poseen células quitinizadas, normalmente no móviles. El inicio de la infección se realiza por germinación de las esporas del hongo sobre el tegumento del individuo plaga. La dispersión de las esporas se realiza por contaminación ambiental a través del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto

con otros sanos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro de hospedantes (insectos y ácaros). El hongo sale del insecto enfermo a través de las aperturas (boca, ano, orificios de unión de los tegumentos y artejos) y en el exterior forma sus estructuras fructíferas y las esporas (11).

Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento, que corresponden con las esporas germinadas del hongo. Normalmente, los hongos, son entomopatógenos de acción lenta. Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos. Pero estos microorganismos dependen generalmente de las condiciones ambientales de temperatura (25 °C) y de elevada humedad relativa para su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. Se suelen comercializar en preparados a base de esporas que deben estar en agua unas 24 horas antes de su aplicación (11).

Generalmente tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima o al menos en que éste deje de alimentarse. Son adecuados para su aplicación por introducción, manipulación ambiental o aumento inoculativo, pero no para aumentos inundativos. Comercialmente destacan los siguientes hongos entomopatógenos (11):

- A. *Beauveria bassiana*: Ataca Coleópteros.
- B. *Verticillium lecanii*: Ataca áfidos, moscas blancas y tisanópteros.
- C. *Metarrhizium anisopliae*: Ataca Homópteros, en general.

La Virulencia de ciertos hongos entomopatógenos puede ser reducida o perdida por cultivo repetido en medios artificiales. Este fenómeno está bien documentado con *Beauveria bassiana* en la cual la reducción en virulencia ocurrió después de 16 transferencias y la producción de toxinas fue reducida después de cultivos repetidos. En la mayoría de los casos se reduce pero no desaparece totalmente y puede ser restaurada al nivel original inoculándolos sobre el hospedero fuente (3).

Se ha propuesto la incorporación de grasas animales del sustrato nutritivo para mantener la virulencia. También la adición de varios químicos tales como insecticidas o quitina y además tratamientos tales como la irradiación de esporas que aparentemente indican mutantes estables con virulencia incrementada (3).

3.1.4. CARACTERISTICAS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

3.1.4.1. Entomophthorales

El orden Entomophthorales incluye el grupo más importante de los hongos entomopatógenos de la clase Phycomycetes aunque tales hongos también se encuentran en los órdenes Mucorales, Blastocladales y Chytridiales. La mayoría de los autores reconocen que la familia Entomophthoraceae compuesta de varios géneros como *Empusa*, *Entomophthora* y *Masospora*, están formadas principalmente por especies entomopatógenas (3).

Entre las especies más conocidas en *Entomophthora* están: *E. grylli* Fres., encontrada en varios Ortópteros y Lepidópteros; *E. sphaerosperma* Fres., común en Díptera, Hemíptera, Lepidóptera y otros insectos; *E. aulicae* que se encuentra infectando orugas de palomillas de cola café (Lep.: Lymantriidae) y otros insectos; *E. fumosa* Speare en piojos harinosos (Hom.: Pseudococcidae); *E. aphidis* Hoffman y *E. exitiales* Hall y Dunn en áfidos (Hom.: Aphididae) (3).

3.1.4.2. Blastocladales

Los Blastocladales se encuentran en un solo grupo, la familia Coelomomycetaceae, la que parasita principalmente larvas de mosquito. Se han encontrado infectando especies de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Psorospora* y *Uranotaenia*, en la Federación de Estados Malayos, India, Rusia, Estados Unidos y Africa. La incidencia natural de la infección en poblaciones de mosquito puede variar desde muy baja hasta el 95% (3).

3.1.4.3. Cordyceps

Los primeros hongos entomopatógenos fueron especies del género *Cordyceps* (clase Ascomycetes). Se conocen aproximadamente 250 especies, y han sido estudiados principalmente desde un punto de vista taxonómico. El género *Cordyceps* tiene una distribución cosmopolita y se presenta en especímenes de varios órdenes de insectos, principalmente Hymenóptera y Coleóptera (3).

Se cree que algunas especies de *Cordyceps* tienen un estado conidial, el cual se incluye en géneros de hongos imperfectos como *Spicaria*, *Botrytis* e *Hirsutella* (3).

El ciclo de vida de la mayoría de los *Cordyceps* es similar al de los hongos entomopatógenos en general. El tubo germinativo de la espora atraviesa el integumento del hospedero penetrando la cavidad del cuerpo, en la que se desarrolla y forma un esclerocio, el cual eventualmente dará origen a un estroma fresco y a esporas (3).

3.1.4.4. Muscardina

Todos los hongos involucrados son hongos imperfectos. Recientemente se han reconocido como se mencionó anteriormente cerca de 14 especies de *Beauveria*. MacLeot, citado por Bach (1987) (3), revisó el género y redujo las 14 especies a sinónimos de *Beauveria bassiana* y *Beauveria tenella*. Bassi, citado por Bach (3), en la primera mitad del siglo XIX, realizó sus experimentos clásicos, probando que la muscardina blanca fue causada por éste hongo. Se debe comprender claramente que el mismo hongo es el responsable de la enfermedad de un gran número de insectos, y que en ciertas ocasiones se ha mostrado prometedor como medida de control para ciertos insectos destructivos.

Sobre la chinche hedionda (Hem.: Cydnidae), la variedad globulifera de *B. bassiana*, se manifiesta en forma normal por un crecimiento algodonoso blanco o harinoso, que a veces llega a envolver completamente al insecto. Aproximadamente en tres días el insecto muere a causa de la infección (3).

3.1.4.5. Otras micosis

Otro género de hongos imperfectos que contiene especies entomopatógenas importantes es *Spicaria* el cual se encuentra infectando a varias especies de Lepidópteros y Coleópteros. Se conocen cerca de 15 especies. El nombre del género *Isaria* se descartó a favor de *Spicaria* (3).

3.1.5. DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR HONGOS ENTOMOPATOGENOS

De manera general, el desarrollo de las micosis en insectos (**Figura 1**) comienza por la adhesión al tegumento y la germinación de los conidios o esporas sobre éste. Luego se produce la penetración a través de la cutícula del insecto, la multiplicación del hongo en el hemocele y la producción de toxinas (en ciertos hongos o cepas). Sobreviene entonces la muerte del insecto y el hongo coloniza todo el interior del hospedero. Posteriormente, el micelio sale hacia el exterior pasando a través del tegumento, esporula sobre la superficie del insecto y finalmente los propágulos son diseminados al medio (5).

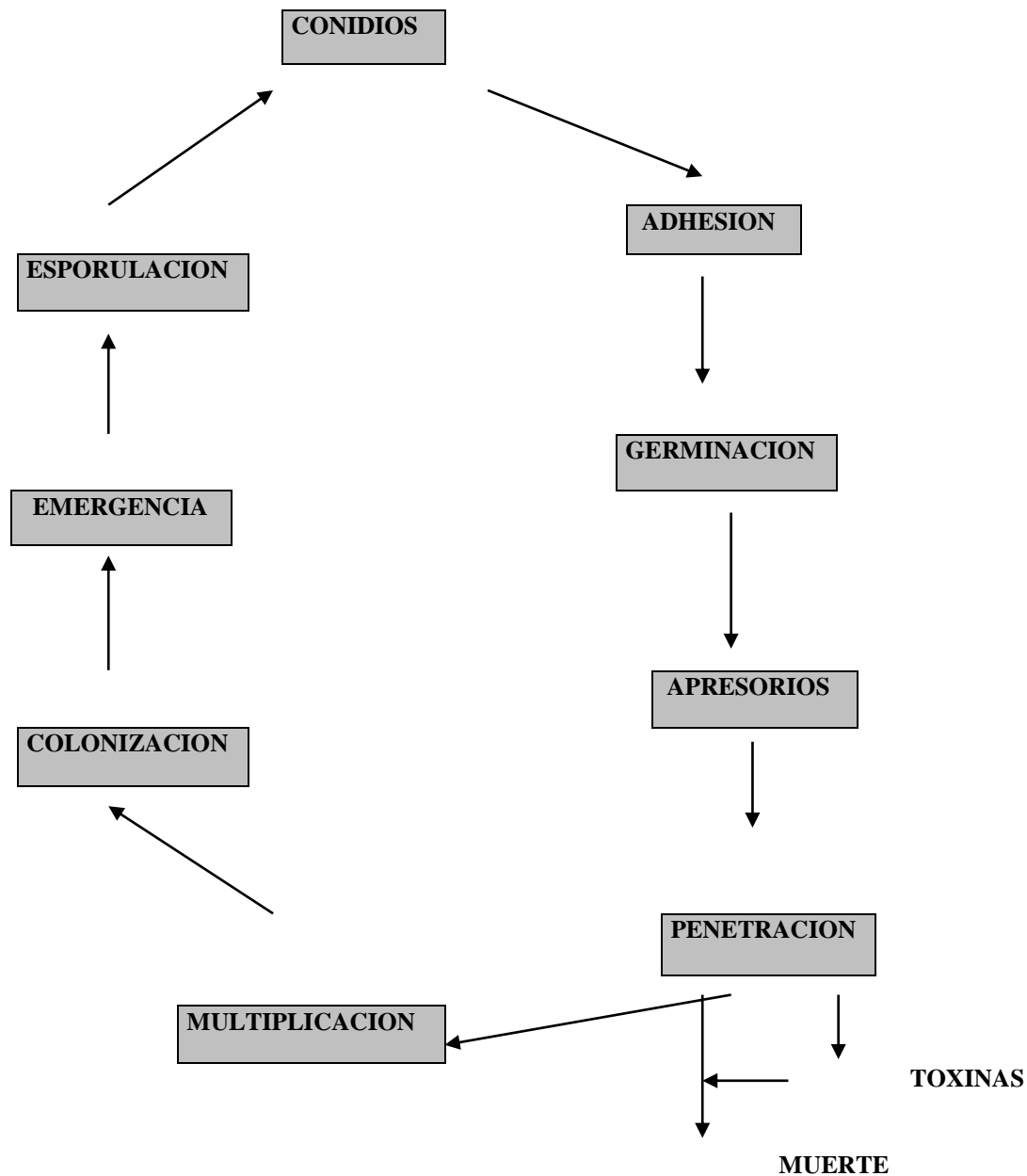


Figura 1. Ciclo de infección de un hongo entomopatógeno, según Carballo, 1998 (5).

3.1.5.1. Unión de unidad infectiva a la epicutícula

Ocurre la fijación de los propágulos o unidades infectivas sobre la superficie del hospedero por medio de mecanismos donde intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas del patógeno y del hospedante. En el proceso de adhesión, se distinguen tres fases, la **primera** es la adsorción o inmovilización del microorganismo sobre la superficie, donde intervienen factores físicos y químicos del sustrato, como fuerzas de Van der Waals y electrostáticas. La **segunda** es el contacto por la interacción del patógeno y el hospedero y la **tercera** es la adhesión que puede ser pasiva sin requerimientos de energía o activa la cual sí necesita energía (5).

La adhesión es un paso importante en el proceso patogénico y ha sido correlacionada con la especificidad hospedero-patógeno y con la virulencia. Existen sitios preferenciales del tegumento del hospedero donde los conidios se adhieren, germinan y penetran y estos lugares corresponden a las regiones intersegmentales del insecto aunque los hongos poseen la capacidad de penetrar tanto por regiones membranosas como por las áreas más esclerosadas del tegumento (5).

3.1.5.2. Germinación

Sobre la cutícula del insecto la espora produce uno o dos tubos germinativos. Esto ocurre en un mínimo de 12 horas y depende de la humedad ambiental, la temperatura y en menor grado de las condiciones de luz y ambiente nutricional. Sin embargo hay una serie de variaciones, por ejemplo, el hongo puede producir la emisión de un tubo germinativo corto que perfora el tegumento, emisión de un tubo germinativo largo que no es capaz de penetrar el tegumento, emisión de un tubo germinativo corto y en cuya extremidad se forma un conidio secundario de tamaño y forma diferente al del primario, o bien no puede germinar del todo (5).

3.1.5.3. Formación de apresorios

El apresorio es una dilatación de hifas en la extremidad del tubo germinativo. Este no se forma cuando penetra por aberturas naturales. La función del apresorio puede ser debilitar la cutícula del insecto en sus puntos de contacto, fijación al tegumento durante la penetración o bien representa un paso de transición entre el tubo germinativo y la formación de la estaquilla de penetración (5).

3.1.5.4. Formación de estaquilla de penetración

Esta se forma en la parte inferior del apresorio y penetra la epicutícula del insecto. Se ha comprobado la presencia de sustancias mucilaginosas entre el apresorio y la superficie del hospedero que ayudan a la fijación al tegumento (5).

3.1.5.5. Penetración

Aunque la principal vía de penetración es la cutícula y las regiones intersegmentales, también pueden penetrar por la boca y el ano. El modo de penetración de la cutícula depende de la dureza y esclerotización de la cutícula, así como la presencia de sustancias antifungales y nutricionales. Las cutículas más duras son más difíciles de penetrar (5).

Ocurre por dos formas, el **primero** es el proceso físico por presión de hifas que rompen las áreas membranosas o esclerosadas y el **segundo** es el proceso químico por elaboración de enzimas (proteasas, lipasas y quitinasas) producidas por la hifa infectiva de los entomopatógenos que facilitan la penetración mecánica (5).

En el área de procutícula o alrededor de la penetración aparecen síntomas de histólisis, esto es la descomposición del tejido por acción enzimática. Estas enzimas son producidas secuencialmente reflejando el orden del sustrato sobre el cual actúan, primeramente sobre las capas cerosas de la epicutícula y luego sobre la matriz de proteína y quitina. Sin embargo la secreción de enzimas durante los primeros estados de desarrollo de un hongo, no siempre es condición suficiente para asegurar la penetración al tegumento (5).

Cuando la penetración ocurre vía bucal, la espora puede germinar rápidamente en el ambiente digestivo pero los fluidos digestivos pueden destruir la espora o hifa germinada. En muchos casos esta digestión de las estructuras fungales puede causar la muerte más por las toxinas liberadas que por la micosis (5).

3.1.5.6. Multiplicación del hongo en el hemocele

Una vez en el interior del insecto, el hongo se multiplica principalmente por gemación, dando formas micelianas libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes. Los insectos tienen un sistema inmunológico que les permite reconocer y reaccionar a partículas extrañas dentro del hemocele que pueden ser fagocitados si no son muy grandes, sin embargo, el principal mecanismo de defensa es la encapsulación la cual se produce por la concentración de plasmocitos o granulocitos alrededor del punto de infección, logrando formar una masa pseudotisular llamada granuloma (5).

3.1.5.7. Producción de toxinas

No todos los hongos o todas las cepas de una misma especie fúngica producen toxinas en el hemocele. El término toxina se refiere a toda sustancia venenosa producida por organismos patógenos. Son sustancias que pueden originar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de células de la hemolinfa (**Cuadro 1**) (5).

Cuadro 1. Toxinas producidas por los principales hongos entomopatógenos.

HONGO	TOXINAS	ACCION TOXICA SOBRE
<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Beauvericina	Larvas de mosquitos y moscas adultas
<i>B. bassiana</i> y <i>B. brongniarti</i>	Beauverolides Isarolides Tenellina Bassianina Oosporeina Acido oxálico Bassianolide	Larvas de mosquitos y moscas adultas
<i>B. bassiana</i> y <i>Verticillium lecanii</i>	Destruixinas Citocalasina Indeterminas	Larvas de <i>B. mori</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Cordiceptina	Larvas de <i>B. mori</i>
<i>Nomuraea rileyi</i>	- - - -	Adultos de <i>Calliphora</i>

Fuente. Carballo, M. Hongos entomopatógenos. 1998.

3.1.5.8. Muerte del insecto

La muerte del insecto parasitado ocurre generalmente antes de que el hongo colonice todo el interior del hemocele, entre los 4 a 7 días después dependiendo del insecto. Es originada en parte por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte ocurre por micotoxinas, histolíticas y por el bloqueo mecánico del aparato digestivo que conlleva también a deficiencias nutricionales (5).

La muerte del hospedante, marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos y compitiendo en ciertos insectos con la flora bacteriana intestinal. El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá de la cepa, del hospedante y de los factores ambientales. Se pueden observar cambios en su comportamiento normal antes de la muerte y cuando ella ocurre, no se observan aún signos visibles de una enfermedad fúngica (5).

3.1.5.9. Colonización total

Después de la muerte el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por las hifas filamentosas. La secuencia de la colonización es, primero los cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi y sistema nervioso, músculos y tráqueas. El tiempo de colonización del hongo está entre 76 a 120 horas (5).

El cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente y sin poder generalizar, debido a la acción de antibióticos liberados por el hongo, entre ellos el Oosporin en *Beauveria bassiana* o el Cordycepin en *Cordyceps militaris*. Estas momias sirven como reservorio del hongo para pasar las condiciones climáticas adversas (5).

3.1.5.10. Emergencia del hongo hacia el exterior

Dentro del cuerpo del insecto, el hongo forma una gran masa miceliar, manteniendo intacto el tegumento. Permanece bajo esta forma mientras la humedad sea baja pero en ambientes húmedos y cálidos, atraviesa nuevamente el tegumento pero desde el interior hacia el exterior, a través de las áreas poco esclerosadas como las membranas intersegmentales o los espiráculos, aunque esto dependerá también del hospedante y de su estado de desarrollo (5).

3.1.5.11. Esporulación

Una vez que las hifas han atravesado el tegumento, pueden permanecer en etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de las 24 - 48 horas, con formación de conidios o esporas si las condiciones de humedad relativa son altas. El hongo toma la coloración característica al esporular, dependiendo de la especie particular (5).

3.1.5.12. Diseminación

Los conidios o esporas formados sobre el insecto se diseminan por acción del viento, agua, el hombre o de otros organismos y dan inicio a un nuevo ciclo de infección (5).

3.1.6. PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, soya y frijol, pero los más utilizados son arroz y trigo (23).

3.1.6.1. Antecedentes

La aseveración de Krassiltschik, citado por Bach (3): "La idea de controlar los insectos por medio de epidemias artificiales inducidas expresada hace unos veinte años por los hombres de ciencia, se ha convertido en realidad y en el futuro será perfeccionada y ampliamente utilizada", parece haberse hecho muy al principio de la patología de los insectos, ya que Metchnikoff y Krassiltschik, fueron los que realizaron en 1880 el primer intento exitoso para producir en forma masiva el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor., sin antes tener numerosos problemas, aparte de los requerimientos nutricionales, que debieron resolver. Al principio Metchnikoff encontró que *M. anisopliae* podía crecer y esporular fácilmente en una solución azucarada, en gotas suspendidas, pero que no podía reproducirse en grandes volúmenes de líquidos. Werigo, citado por Bach (3), sugirió entonces una masa de cerveza como un medio para producción en gran escala, teniendo éxito. Después de esto Krassiltschik desarrolló métodos de producción a gran escala, su mayor preocupación fue producir grandes cantidades de esporas viables a costo reducido y por lo tanto se enfrentó inmediatamente con tres problemas principales: 1) El desarrollo de procedimientos simples que pudieran ser llevados a cabo por personas no muy calificadas, 2) El desarrollo de recipientes irrompibles, y 3) La eliminación de la contaminación. Estos tres problemas fueron resueltos en Semela, una estación experimental construida en 1884, en donde realizó operaciones de cultivo a gran escala, usando un sistema cerrado de pipas inaccesibles para el polvo y esporas indeseables. Los recipientes de mayor tamaño fueron de metal. Gracias a este procedimiento los trabajadores realizaron solo operaciones simples. Para evitar la esterilización frecuente se inyectó dentro de los recipientes, sin que éstos se hubieran esterilizado previamente, medio estéril fresco después de haber colectado el medio viejo con esporas; las esporas de hongos que quedaban en los recipientes podían automáticamente iniciar el siguiente cultivo.

El método de cultivo masivo desarrollado por Metchnikoff y Krassiltschik fue posteriormente aplicado en Francia hacia el año 1892 por Giard, tado por Bach (3), para cultivar *Beauveria tenella*. En su reporte, Giard llegó a varias conclusiones, primero había posibilidad de una disminución de virulencia después de varias pasadas en cultivos *in vitro*, luego se presentaba el problema de la estandarización de la

mezcla de esporas cuando se venden en el mercado. Para 1959 Steinhaus y Fisher, citados por Bach (3), mencionan el problema de la infecciosidad de los patógenos de insectos para los animales domésticos y para las plantas cultivadas, pero ya Giard había realizado pruebas de patogenicidad vía oral en humanos y otros vertebrados con un patógeno de insectos.

3.1.6.2. Métodos de producción

Existen tres métodos de producción de hongos entomopatógenos: **artesanal, semi-industrial e industrial** (23).

A) *Multiplicación artesanal:* Se inicia con un cultivo puro al que se denomina “hongo patrón” o “semilla”. Este material es suministrado por el laboratorio a los talleres artesanales. Posteriormente, en los talleres se deposita el sustrato en bolsas del polipropileno y se pone a hervir, para el caso de sustratos que necesitan cocción, por una hora durante tres días consecutivos. El sustrato en bolsas es inoculado con el hongo patrón y se deja en condiciones ambientales hasta que el hongo logra colonizar el sustrato. Cuando la bolsa del sustrato es colonizada completamente, se lava con agua. El caldo o mezcla obtenido del lavado del sustrato, se aplica para el control de las plagas.

B) *Producción semi-industrial:* Este tipo de proceso se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. En general el proceso está organizado en dos etapas: **La etapa de cepario** que comprende el aislamiento de la cepa y la obtención del cultivo puro. Además se considera el mantenimiento, reactivación y preservación de las cepas, **y la de producción** que comprende la preparación de los sustratos, inoculación e incubación de matrices y bolsas, el proceso de secado (bandeja), la cosecha del hongo y la preparación de las formulaciones. El tiempo empleado en desarrollar el proceso de producción es de aproximadamente un mes.

C) *Producción industrial:* Es la producción de entomopatógenos a gran escala, para lo cual se utilizan recipientes de gran tamaño.

3.1.6.3. Formas de producción

Las formas de producción de los hongos entomopatógenos son (15):

A) *Medios de cultivo comerciales:* De acuerdo a Garza y Hernández (15), se emplean generalmente en trabajos experimentales para la obtención de cultivos puros, los siguientes:

- a. Agar Sabouraud Dextrosa con extracto de levadura.
- b. Sabouraud Dextrosa con extracto de Malta.
- c. Agar Sabouraud Maltosa con extracto de levadura.
- d. Papa Dextrosa Agar.

B) Medios líquidos: Mediante la fermentación, se pueden obtener blastosporas o micelios, cuyo producto se centrifuga y el sedimento se conserva en sacos de polietileno.

C) Medios semi-líquidos: La producción de éste, es en función de caldos más espesos; se emplean soya, frijol, arroz, trigo, caldo de carne.

D) Medios sólidos: Se emplean granos de cereales, como arroz, maíz, soya, frijol, trigo, cáscaras, aserrín, etc. La manera de generar este tipo de producción ha ido evolucionando a medida que las necesidades de producción masiva han aumentado.

3.1.6.4. Sustratos

Los medios utilizados para el cultivo masivo de microorganismos son ya sea sólidos o líquidos. Los medios usados en la producción en gran escala de microorganismos son principalmente oligídicos (medios en los cuales los materiales orgánicos no elaborados proporcionan la mayoría de los requerimientos dietéticos) y contienen materiales orgánicos no elaborados. Los microorganismos son producidos en cultivos superficiales (sobre medios sólidos o líquidos) y en cultivos sumergidos, en medios líquidos. Actualmente, los métodos de cultivo superficial son considerados como demasiado laboriosos y caros para la producción en gran escala. Sin embargo, se sabe que la mayoría de los hongos producen micelio solamente en medios sumergidos los cuales, por lo común, no esporulan mientras se encuentran sumergidos. Estos organismos presentan problemas difíciles desde el punto de vista de producción masiva. En el caso de los hongos, una combinación de una fase sumergida (para una producción de micelio) y una fase superficial (para esporulación) pueden ser preferidos industrialmente con relación solo al cultivo superficial para la producción de grandes cantidades de esporas (3).

Los materiales no elaborados más frecuentemente usados para el cultivo de hongos entomopatógenos en cantidades son el camote, la papa, harina de maíz, avena, salvado de arroz, pan, melazas, tallos de *Canna* y *Caladium*, amasijo de cerveza, aserrín, caldo de carne, carne de cerdo, excrementos de perros, sangre, peces espada y arenque. Algunos técnicos han usado medios más caros, tales como el Sabouraud dextrosa agar, pero es de dudarse su uso en la producción comercial en gran

escala desde el punto de vista comercial. El medio utilizado por varios técnicos se combina con un medio ambiente adecuado para el crecimiento y esporulación con una fácil preparación y bajo costo (3).

Muller y Koglerm, citados por Bach (3), sugieren que los materiales sueltos rinden más esporas que los medios con agar, debido a que la relación esporas por unidad de peso de medio está directamente relacionado con el área de superficie del medio.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) y el camote (*Ipomea batatas* L.) han sido usados por numerosos técnicos, particularmente para la producción masiva de especies de *Aschersonia*. Fawcett, citado por Bach (3), preparó su medio con el siguiente método: los camotes se lavaron, pelaron, se lavaron de nuevo y se pasaron a través de un molino de carne. Lista la masa fue posteriormente lavada en agua caliente, a fin de eliminar partículas finas, y el medio húmedo fue esterilizado en un autoclave a temperatura de 100°C por 20 minutos o más.

El arroz (*Oriza sativa* L.) ha sido muy usado por Rorer y Gough, citados por Bach (3), el arroz se lavó adecuadamente y se coció por 10 a 15 minutos, posteriormente se secó y se colocó, aún caliente, en vasos de cultivo y se metió en un autoclave por espacio de una hora a 100°C, por tres a cuatro días sucesivos. En los primeros experimentos el arroz hervido no se metió al autoclave, pero era fácil que se presentara la contaminación.

Rodas (1982) (26) evaluó siete sustratos para la reproducción del entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill a nivel de laboratorio, utilizando para ello los siguientes sustratos: Trigo, arroz, sorgo, papa, maíz, soya y pulpa de café, sometidos a condiciones variables de luz (oscuridad y régimen mixto de luz) y temperatura (ambiente y 28 °C), encontrando que el sustrato arroz bajo condiciones de luz mixta y temperatura de 28 °C fue el que produjo la mayor concentración de esporas por gramo (1.0431×10^{08}) en comparación con los restantes seis sustratos.

Marroquín (1984) (21) evaluó cinco productos no elaborados (granos básicos) como medios para la reproducción masiva del entomopatógeno *Metarhizium sp.* Entre los sustratos utilizados están: Arroz, maíz quebrado, trigo, sorgo y cebada, los cuales se encontraban bajo condiciones variables de luz (oscuridad y luz) y temperatura (22, 26 y 30 °C), estableciendo que el mejor medio de cultivo fue el arroz precocido a una temperatura de 26 y 30 °C con una concentración promedio de 2.25×10^{06} esporas/cc, seguido en importancia por el maíz quebrado (1.80×10^{06} esporas/cc) y luego indistintamente el trigo, sorgo y cebada.

Morales (1990) (24) evaluó seis sustratos (olote de maíz quebrado, sorgo entero, fertilizante entero orgánico comercial (Fertipest), afrecho de trigo, trigo entero y trigo quebrado) para la reproducción de cinco cepas de hongos entomopatógenos (dos cepas de *Spicaria sp.* y tres cepas de *Beauveria sp.*), concluyendo que el sustrato trigo quebrado fue el más efectivo para la reproducción de las cepas evaluadas, pero debido a que tomó una consistencia pastosa que dificultó su manejo, el sustrato más apropiado fue el sorgo entero.

Rodríguez (2000) (28) evaluó el maíz amarillo como sustrato alternativo, en lugar de arroz, para el crecimiento, desarrollo y producción de conidias del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor., para tal efecto estableció dos tratamientos con maíz **a)** Maíz puesto en agua destilada por tres horas, **b)** Maíz precocido con agua de tubo durante 4 minutos a 100 °C y un tratamiento con arroz precocido (Testigo), las variables que evaluó fueron las siguientes: cobertura del hongo sobre el sustrato (%), concentración y viabilidad (%). De acuerdo a los resultados obtenidos concluyó en que el sustrato arroz obtuvo el mayor porcentaje de cobertura y concentración (86.5% y 3.64×10^{11} respectivamente), pero no así el porcentaje de viabilidad, ya que el mayor lo obtuvo el sustrato maíz puesto en agua destilada por espacio de tres horas, con un 96.0%.

Rodríguez (2000) (27) evaluó dos calidades de arroz comercial: 81% grano entero (arroz azul) y 90% grano entero (arroz rojo), con el objeto de verificar la calidad y cantidad de conidias del entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor. Los resultados obtenidos mostraron una producción de 1.14×10^9 conidias en las bolsas tratadas con arroz al 81% de grano entero y 1.02×10^9 conidias en aquellas tratadas con el arroz al 90% de grano entero.

Alemán y Ovalle (1998) (1) utilizaron la cepa CG 93-3 del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor. para el control de la chinche salivosa, *Aeneolamia sp.* y *Prosapia sp.*, en el cultivo de la caña de azúcar, para lo cual utilizaron el sustrato arroz como medio para su producción en grandes cantidades, realizando para ello una serie de actividades las cuales se agrupan en **dos** fases:

- A. Fase de aislamiento e incremento del hongo:** Revigorización, aislamiento, prematrices y matrices.
- B. Fase de producción de conidios:** Preparación del medio de cultivo, preparación de la suspensión inoculadora, inoculación y preincubación, incubación, secado y almacenamiento.

El cultivo a gran escala de hongos requiere de un buen conocimiento de las condiciones ambientales responsables de: **1)** germinación, **2)** crecimiento, y **3)** esporulación. La identificación de los factores nutricionales responsables se hace posible solo cuando el microorganismo en cuestión puede

desarrollarse en un medio holídico (medio en el cual los constituyentes que lo forman, aparte de los materiales inertes purificados, tienen una estructura química conocida antes de formar el compuesto). La mayoría de los estudios están limitados a la germinación de las esporas y su crecimiento y poco se sabe de la esporulación. Cochrane, citado por Bach (3), ha señalado que la esporulación es iniciada por factores que controlan el crecimiento de un micelio establecido sin envenenar muy drásticamente su metabolismo. Pero el mecanismo íntimo aún no ha sido definido. Bartlett y Lefebvre, citados por Bach (3), reportan que la humedad juega un papel importante en la esporulación de los hongos entomopatógenos. La producción de esporas se disminuye cultivándolas sobre un medio fluido o en un sólido en presencia de una humedad relativa alta. La condición ideal para la producción de esporas se encontró que era un medio muy mojado pero no húmedo, con una humedad baja que se mantenía después de la germinación de las esporas. También los factores nutricionales juegan un papel importante en la esporulación. Aunque es cierto que no hay evidencia concluyente para un factor nutricional específico requerido para la esporulación y no requerido para el crecimiento, la cantidad absoluta de algunos nutrientes requeridos para la esporulación es mayor que las que sostienen el crecimiento. Shanor, citado por Bach (3), encontró que la periteca de *Cordyceps militaris* (L.K.) puede ser producida en pupas muertas pero no en las que se han sometido al proceso de esterilización de autoclave. Variedades de *Beauveria bassiana* produjeron la mayor cantidad de esporas en el medio de Sabouraud maltosa agar, seguida del medio de Molish, sangre con una base de agar, el medio de Raulin-Thom Y Czapek-Dox, papa dextrosa y harina de maíz. Hall y Dunn, citados por Bach (3), encontraron que el medio Sabouraud dextrosa agar era el más adecuado para el crecimiento y producción de esporas conidiales de *Entomophthora coronata* y *E. virulenta*, mientras que este mismo medio necesitaba ser fortificado por un cereal rico a fin de obtener un crecimiento adecuado y una buena producción de esporas de *E. exitialis*.

Entomophthora muscae Cohn parece necesitar trabajos mas elaborados; un buen desarrollo, conidias y estados resistentes han sido producidos por Schweizer, citado por Bach (3), en un medio que contenía sangre y gelatina de caldo de carne. En lugar de la sangre, se puede hacer uso de urea, ácido úrico, ácido hipúrico, hipoxantina, creatina, xantina y lecitina, así mismo considera a la actividad enzimática del medio como esencial para el crecimiento, junto con las grasas y el *d*-glucosamina: por lo tanto recomienda la esterilización en frío del medio. Sin embargo, no se puede generalizar para todo el grupo de hongos entomophthoraceos.

Sawyer, citado por Bach (3), encontró que los carbohidratos y grasas no son esenciales para el crecimiento de dos especies de *Entomophthora*, mientras que la proteína se necesita para que completen su ciclo de vida. El nitrógeno orgánico es requerido para el crecimiento micelial de *Hirsutella gigantea* Petch. Schaerffenber, citado por Bach (3), recomienda la adición del 3% de peptona a un medio de

extracto de malta, para la producción en gran escala de esporas de *Beauveria bassiana*. Parece que *Metarhizium anisopliae* tiene una maquinaria sintética mejor adaptada; no muestra requerimientos especiales por carbohidratos y aprovecha ambas fuentes de nitrógenos, el orgánico y el inorgánico por lo que se refiere al crecimiento.

3.1.6.5. Proceso de producción

A) **Aislamiento:** Consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, la cual puede ser insectos, plantas o medios artificiales como PDA (cajas de Petri, tubos de ensayo, entre otros) o de preservación en seco como la silica gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a la inoculación de un medio de cultivo, para la obtención de un cultivo puro. Debido a que se trata del paso inicial del proceso de producción un error afecta todo el proceso. Por tal razón se debe estar seguro que el hongo aislado corresponde al hongo que interesa, además debe estar libre de contaminantes y tener un buen vigor para su crecimiento (23).

El aislamiento de hongos entomopatógenos puede hacerse de dos maneras:

- a. **Dilución seriada:** Es el método más utilizado, consiste en colocar un insecto esporulado en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80. La suspensión resultante se debe agitar bien por 1 minuto, para que las conidias se desprendan del cuerpo del insecto. Como resultado se obtiene una suspensión concentrada del inóculo más 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 1 ml de la solución madre a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80, éste se agita fuertemente durante 1 minuto, luego se coloca 1 ml de esta suspensión en otro tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril mas 0.01% de Tween 80, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener 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^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).
- b. **Dilución directa:** Consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo. Esta técnica es desventajosa debido a que las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y contaminar el aislamiento. Por esta razón se recomienda hacer una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio (3 - 5%), enjuagándose con agua destilada estéril. Este tipo de aislamiento puede ser de dos formas:
 - i. Raspando partículas del hongo en un insecto desinfectado, utilizando un asa bacteriológica y pasándola en un medio nutritivo.

- ii. Con una pinza seca y estéril se toma el insecto esporulado desinfectado y se agita con movimientos verticales y horizontales sobre la superficie del medio de cultivo (23).

B) Obtención de cultivos puros: Para obtener los cultivos puros se hace un reaislamiento del hongo a partir del cultivo o fuente de inóculo original. El inóculo se siembra o deposita en cajas de Petri que contienen el medio de cultivo PDA o cualquier otro medio. Este cultivo se conoce como puro porque únicamente está el hongo que se desea producir, sin contaminantes. El cultivo puro es la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción, ya que es utilizado para la inoculación de matrices (23).

C) Incubación del cultivo: Se realiza después de la inoculación, para lo cual las cajas de Petri se colocan en los lugares de crecimiento a una temperatura entre 24 y 28 °C durante 4 - 6 días. En ese período se observa el crecimiento del micelio. Se deben realizar observaciones cada 48 horas para eliminar los contaminantes. Después de obtener el cultivo puro se inicia el proceso de producción propiamente dicho, para lo cual se utiliza un producto no elaborado como sustrato de producción (arroz, maíz, trigo, soya, etc.) (23).

D) Incubación de matrices y bolsas: Para la incubación de matrices y bolsas se utiliza un producto no elaborado precocido como sustrato natura, el cual es humedecido y esterilizado previamente para lograr un buen crecimiento del hongo. Para la preparación del sustrato precocido, se coloca un recipiente con agua en la estufa. Cuando el agua comienza a hervir se vierte el sustrato y se mantiene durante 5 minutos (debe tener una consistencia suave). Posteriormente el sustrato se pone a escurrir en una zaranda hasta que este totalmente frío y seco, con el objetivo de procurar que las matrices no adquieran humedad. Para la preparación de la matriz se usan recipientes de vidrio de 500 ml. Se utilizan 100 g de arroz en cada recipiente. Las matrices son esterilizadas en el autoclave durante 4 - 5 minutos a 121 °C y 1.2 bares de presión. Después estas se agitan para evitar aglomeraciones de gránulos de sustrato y lograr un crecimiento homogéneo del hongo sobre las matrices una vez inoculadas. El objetivo de la matriz es reproducir el inóculo para la inoculación de las bolsas (23).

E) Inoculación de matrices y bolsas: Para realizar la **inoculación de las matrices** se prepara una suspensión de inóculo a partir del cultivo puro (PDA), este inóculo debe ser de buena calidad, o sea mostrar un buen crecimiento y estar libre de contaminantes. El inóculo de las cajas es raspado con cuidado hasta obtener un polvo de conidias del hongo. Estas se colocan en 60 ml de agua destilada estéril, para formar una suspensión de conidias que deberá presentar aproximadamente de 1×10^8 conidias (23).

La inoculación de las matrices se realiza con una jeringa usada para uso veterinario, la cual debe ser esterilizada a 121 °C y 1.2 bar de presión. Se inoculan 15 cc de la suspensión del hongo por cada matriz que contiene 100 g de sustrato. La cantidad de inóculo obtenido a partir de una caja de Petri es suficiente para inocular cuatro matrices (23).

Una vez preparadas y debidamente inoculadas, se **incuban las matrices** en un cuarto oscuro a 24 - 28 °C por aproximadamente 8 días. Durante este período el hongo se desarrolla y produce estructuras reproductivas (23).

Las bolsas constituyen el medio de producción definitivo, ya que el hongo que se obtiene al final del proceso es el que crece durante esta etapa. La cantidad de sustrato utilizado en la bolsa depende del tamaño de la bolsa, generalmente se usan 200 g por bolsa. Las **bolsas inoculadas** son una suspensión de esporas obtenidas a partir de la matriz, para lo cual se deben preparar tanto bolsas como el inóculo (23).

Para la preparación de las bolsas se depositan 200 g de sustrato en bolsas plásticas de polipropileno y se les agregan 100 ml de agua (destilada o potable), éstas se sellan debidamente para ser esterilizadas en el autoclave a 1.2 bar de presión y 121 °C durante 4 – 5 minutos. Después de esterilizar las bolsas, se deben agitar con el objetivo de evitar aglomeraciones para que el inóculo se distribuya uniformemente en el sustrato y se obtenga un crecimiento homogéneo. Para la preparación del inóculo a cada una de las matrices (colonizadas por el hongo) se les agrega 750 ml de agua destilada estéril al 0.1% de extravón y se agita el contenido, hasta obtener una suspensión de conidias aproximadamente de 600 ml de suspensión. Cada una de las bolsas de 200 g de sustrato se inocula mediante 20 cc de la suspensión, para lo cual se utiliza una jeringa veterinaria previamente esterilizada. Con la suspensión de inóculo obtenida de cada matriz se inoculan aproximadamente 30 bolsas de 200 g (23).

Las bolsas inoculadas se colocan en los cuartos de crecimiento donde permanecen entre 4 y 6 días, durante este período se revisan las bolsas diariamente, eliminando aquellas que presentan crecimiento lento y no uniforme, débil y las que están contaminadas (23).

F) Secado: Su objetivo es la eliminación de la humedad del hongo y su reproducción. El sustrato contenido en las bolsas es depositado en bandejas plásticas que presentan orificios en el fondo. Las bandejas se dejan a temperatura ambiente para que se sequen. Al inicio las bandejas se mantienen selladas y posteriormente se abren. El hongo está listo para la cosecha cuando el sustrato tiene una humedad de 4 y 6% (23).

G) Cosecha: Consiste en separar del sustrato las estructuras del hongo (conidias y/o esporas) para su posterior formulación. El polvo que se obtiene contiene esporas y/o conidias y micelio más las partículas del sustrato. El contenido de las bandejas (sustrato colonizado) se deposita en un tamiz de 1 mm, luego por agitación y frotación, se separa el polvo del sustrato. El material retenido por el tamiz se descarta y el polvo recolectado se deposita en recipientes para evaluar el rendimiento (23).

En condiciones ambientales, las conidias cosechadas pueden ser afectadas por la luz, humedad y altas temperaturas, por lo que una vez cosechado el hongo se debe mantener en refrigeración para preservar su viabilidad por más tiempo. Durante todo el proceso de producción, el control de calidad constituye un factor clave porque permite garantizar el proceso de producción (rendimiento), además que el producto obtenido es de calidad y se evita la pérdida de materiales y reactivos (23).

H) Almacenamiento: El almacenamiento podrá realizarse en un ambiente con una temperatura que oscile entre 2 y 4 °C, en oscuridad y de preferencia con baja humedad relativa. Estas condiciones pueden obtenerse en un cuarto frío especialmente diseñado para el almacenamiento del hongo en una refrigeradora (dependiendo de la cantidad de hongo a almacenar). Los conidios se pueden almacenar en un cuarto frío por un tiempo máximo de cuatro a cinco meses (1).

3.1.6.6. Contaminantes de los sustratos

Existe una variedad de microorganismos contaminantes que pueden afectar el proceso de producción de entomopatógenos algunos de los cuales son patógenos al hombre. Entre los contaminantes más comunes están los hongos y las bacterias, por las características de crecimiento algunos de ellos son más difíciles de eliminar que otros (23).

La diversidad de contaminantes es mayor en la etapa de cepario que en la etapa de producción (matrices, bolsas y bandejas). Se pueden presentar problemas de contaminación en matrices y bolsas. Sin embargo, en bandejas no hay posibilidad de presencia de contaminantes porque el hongo coloniza completamente el sustrato y utiliza todos sus nutrientes (23).

Se considera contaminante a todo microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio en el cual se cultiva el hongo entomopatógeno. Los contaminantes pueden estar presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio cuando no se cumplen las normas de trabajo para evitarlo. Estos afectan al hongo porque compiten por los nutrientes del medio y por el espacio, además los contaminantes pueden comportarse como hiperparásitos, es decir alimentarse del hongo, además pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas (23).

Entre los hongos contaminantes más comunes están los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Pestalotia* (23):

A) *Aspergillus flavus*: Es un hongo cancerígeno, tiene conidióforos hiálinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula. Conidias globosas a ovales.

B) *Penicillium*: Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del ápice en uno, dos o mas verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en fiálides o células fértiles productoras de conidias, las cuales son producidas basipetalmente y unidas en cadenas. Las conidias son globosas a elípticas, lisas o equinuladas.

C) *Fusarium*: Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran. Estas coloraciones pueden ser naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen macro y micro conidias.

D) *Pestalotia*: Las colonias son blancas y están salpicadas por unas gotas de exudado negro brillante en las que se encuentran millares de conidias del hongo, pueden tener de tres a cuatro septos y son de forma clavada a obclavada o fusoides a veces tienen coloración pálida uniforme. Lo más característico es la presencia de varias setas a un extremo y un pedicelo mas o menos corto al otro extremo.

Todos estos contaminantes se presentan de manera general a excepción de *Pestalotia* que se presenta principalmente en cultivos de *Verticillium*.

Los géneros de bacterias contaminantes más comunes son: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*, ésta última es muy dañina para el proceso de producción de hongos entomopatógenos, porque no forma colonias sino que cubre por completo el cultivo puro donde se encuentre, tomando una coloración roja y por lo tanto es difícil de erradicar (23).

Para evitar el crecimiento de bacterias al medio se le debe de agregar un antibiótico como **penicilina**, **cloranfenicol** y regular el **pH** adicionando **ácido láctico**. Cuando el daño por bacterias es elevado se recomienda asperjar el lugar de trabajo con **formalina** para erradicarla y esterilizar todo el material que presente forma de colonias rojas. El reconocimiento de algunos hongos y bacterias contaminantes se realiza a través del crecimiento, por ejemplo, la presencia de puntos con diferentes formas de coloración. Si el crecimiento del entomopatógeno es lento y seco y se forman colonias cuya

coloración es roja, amarillenta, verde pálido, crema, entonces se trata de hongos. Cuando la contaminación es por bacterias, el entomopatógeno no logra crecer completamente en el sustrato y se forma una masa suave y pueden aparecer en el sustrato manchas de color rojo, cremas y/o amarillentas. Además las bacterias presentan un olor fuerte y desagradable. Los hongos contaminantes presentan un olor característico a fermentación fuerte, el que se diferencia del olor característico de los entomopatógenos (23).

3.1.6.7. Control de calidad

Es una fase muy importante en la producción, en la adquisición de conidias proveedoras y en la aplicación a nivel de campo. En este control, para el caso de la producción de las conidias adquiridas de proveedores, se cuantifican las conidias por gramo de producto (o por cc dependiendo la presentación final) y la viabilidad de los mismos (% de germinación). El control de calidad de las conidias incluye su cuantificación, viabilidad y parasitismo (1).

A) *Conteo de conidias/g (concentración):* Los conidios se cuantifican con la cámara de Neubauer. Inicialmente se pesa una cantidad de producto (conidios puros o formulados) y se suspende en un volumen conocido de una solución de agua y surfactante. Para el conteo de conidias se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) del hongo hasta obtener una que permita realizar del conteo (23).

Cuando se obtiene la dilución para realizar el conteo, usando una pipeta Pasteur se toma una alícuota de la suspensión y se llena la cámara de conteo. Posteriormente, usando un microscopio se hace el conteo de conidias, este paso se repite varias veces hasta obtener un rendimiento promedio (23).

La cámara de conteo consiste en una lámina de cristal un poco mas gruesa que la de un portaobjeto la cual presenta una ranura en forma de **H** y contiene dos camas entre éstas. Para facilitar el conteo, el fondo de la cámara tiene un rayado “Neubauer” y presenta 9 cuadros principales (C.P.) de 1 mm por lado, de los cuales se puede contar el contenido de las cinco, los cuatro de las esquinas y el central. Para propágulos grandes se puede utilizar los cuadros principales, pero para los más pequeños como los de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se usan los cuadros secundarios del cuadro principal central (C.P.) (23).

B) *Viabilidad del hongo:* La viabilidad de un producto es una medida de la cantidad de conidios que tengan la capacidad de germinar, expresada en porcentaje. Para esta evaluación se prepara una

suspensión del producto en un solución de agua y surfactante en un tubo de ensayo. La suspensión se homogeniza y se siembra aplicando de 1 - 3 gotas con una pipeta Pasteur en un medio de cultivo previamente preparado. Las gotas de suspensión se dispersan con una varilla doblada sobre el medio de cultivo y se deja en incubación 20 horas en oscuridad a una temperatura entre 24 – 26 °C, luego se realizan las observaciones al microscopio utilizando el objetivo 25 o 40X. Las variables que se evalúan son: Número de conidias germinadas, número de conidias no germinadas y el total de conidias. Como mínimo deben haber 200 conidias en cada montaje (1).

Con los datos de viabilidad y cuantificación de conidias se procede a realizar las dosificaciones.

3.1.6.8. Preparación del hongo para la aplicación

Para la aplicación de un producto formulado en un sustrato es necesario separar los conidios del mismo. Para tal objetivo se deberá disponer de un recipiente limpio, con una capacidad de 1 – 5 litros; así como una manta limpia. En este recipiente se agrega agua hasta la mitad, adicionando un dispersante (300 cc de dispersante por 100 litros de suspensión). Se coloca el hongo + sustrato dentro de la manta y se sumerge constantemente en la solución de agua y dispersante hasta lavar el sustrato. Posteriormente se cuela la suspensión en otra manta, a manera de eliminar partículas grandes que pudieran haber pasado y luego se completa el volumen de aplicación. La suspensión se agrega en el recipiente de aplicación realizando la misma preferiblemente en horas de la tarde. La aplicación de conidios deberá realizarse en focos en donde aparezca el insecto plaga (1).

3.1.7. TASA MARGINAL DE RETORNO

3.1.7.1. Análisis Marginal

Este tipo de análisis se basa en el concepto de la utilidad que genera la última unidad producida, para esto es necesario saber el costo de la última unidad producida y el ingreso generado por ésta (29).

Este análisis se recomienda generalmente cuando se quieren hacer recomendaciones al agricultor y se utiliza cuando las fuentes de variación (alternativa de producción), en el experimento se enfocan hacia cantidades de insumos y/o mano de obra; por ejemplo distintas cantidades de insecticidas, fungicidas y densidades de población etc., además se recomienda cuando son muchos los tratamientos. No obstante, el buen juicio agronómico y el análisis estadístico llevarán a una decisión respecto a las diferencias de rendimiento entre los tratamientos de un experimento (29).

Si el investigador duda que existan diferencias reales de rendimiento, se comparan los costos variables totales de cada tratamiento y lógicamente se prefiere el de menor costo, si por el contrario se tiene certeza en que las diferencias observadas representan diferencias reales entre los tratamientos, deberá entonces efectuarse un análisis marginal completo (29).

3.1.7.2. Presupuesto Parcial

El presupuesto parcial se utiliza para ordenar datos experimentales tales como las medias de rendimiento de cada tratamiento, así como el precio del producto, el cual multiplicado por el rendimiento promedio dará el Beneficio Bruto. Además debe aparecer el Costo Variable, el cual está integrado por lo que se gasta en insumos o mano de obra y la suma de ambos será el costo variable total.

El presupuesto parcial finaliza sacando la diferencia entre el Beneficio Bruto y el Costo Variable Total, lo que dará el Beneficio Neto (29).

3.1.7.3. Análisis de Dominancia

Una vez obtenido el Beneficio Neto se procede a ordenar los tratamientos colocando los beneficios netos de mayor a menor con su respectivo costo variable, luego se procede a comparar cada una de las alternativas tomando como comparador el costo variable, procediendo a aceptar todas aquellas alternativas con un menor costo variable y eliminando, aquellas con un costo variable igual o mayor. La comparación dará como resultado obtener alternativas dominadas y no dominadas. Serán dominadas (D) las alternativas eliminadas por tener un costo variable igual o mayor y las no dominadas (ND) pasaran al análisis marginal para calcular la tasa marginal de retorno (29).

3.1.7.4. Tasa Marginal de Retorno (TMR)

Para calcular la TMR se procede a ordenar las alternativas no dominadas resultante del análisis de dominancia, tal y como se colocaron en el análisis anterior, o sea, de mayor a menor beneficio neto con su respectivo costo variable, luego se procede a calcular el incremento en Costo Variable (CV) y en Beneficio Neto (BN), finalmente se procede a dividir el incremento en Beneficio Neto entre el incremento en Costo Variable y se multiplica por cien, así (29):

$$\text{TMR} = \frac{\Delta \text{BN}}{\Delta \text{CV}} \times 100$$

De donde:

- a) **TMR** = Tasa Marginal de Retorno
- b) **Δ BN** = Incremento en Beneficio Neto
- c) **Δ CV** = Incremento en Costo Variable

3.2. MARCO REFERENCIAL

3.2.1. ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Ness)

3.2.1.1. Generalidades

El hongo *Verticillium lecanii* es un entomopatógeno que afecta a los insectos de los órdenes Homóptera, Coleóptera, Díptera, Hemíptera, Lepidóptera y Thysanóptera en las regiones tropicales y subtropicales. *V. lecanii* es un hongo imperfecto que pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Deuteromycetes, caracterizado por la formación de micelio septado con producción de conidios de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro o formas de reproducción asexual, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas. Los conidióforos son pequeños, diferenciados desde hifas vegetativas; las células conidiógenas (fiálidas) son alargadas y se estrechan desde la base, se presentan en verticilos de 2-6, apareados o solitarios sobre hifas o apicalmente sobre cortas ramas. Los conidios son hialinos, septados, son liberados dentro de gotas de mucus en los ápices de las fiálidas. El estado sexual es *Cordiceps* o *Torrubiella* (Figura 2) (7, 18).

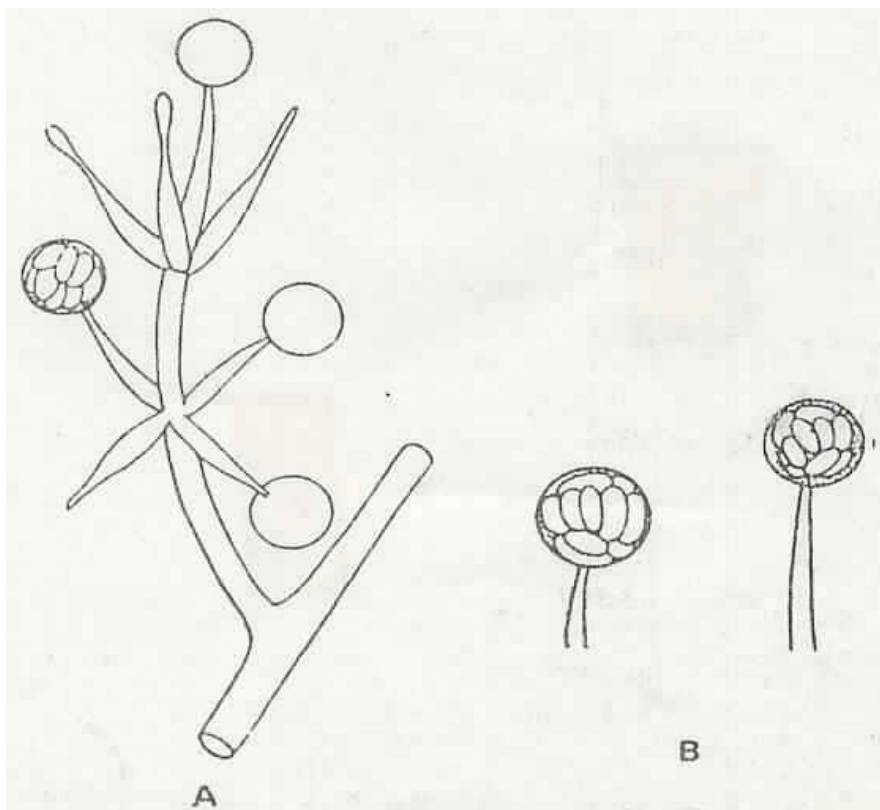


Figura 2. Entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness). A) Conidióforo formado sobre hifa primaria; B) Bolas de conidios envueltos por una masa gelatinosa (7).

3.2.1.2. Taxonomía

Según McCoy y Samson (1988), citados por Garza y Berlanga (14), la clasificación taxonómica de *Verticillium lecanii* es:

División Eumycota
 Subdivisión Deuteromycotina
 Clase Deuteromycetes
 Orden Moniliales
 Familia Moniliaceae
 Género *Verticillium*
 Especie *V. lecanii*

3.2.1.3. Efecto de la humedad y temperatura

A) Humedad: Virtualmente todos los hongos necesitan de alta humedad para la germinación de esporas, crecimiento y esporulación. Las conidias de *V. lecanii* requieren de alta humedad para germinar (85% o más) y posiblemente una película de agua. Para asegurar la germinación máxima de esporas y niveles altos de infección de insectos, los aerosoles de esporas deben ser sincronizados con humedad óptima y aplicados preferiblemente entre 6:00 y 10:00 a.m. y después de las 4:00 p.m. o a cualquier hora en días nublados para evitar al máximo los rayos ultravioleta del sol que afectan las conidias (7, 18).

B) Temperatura: La germinación y colonización de *V. lecanii* se da a una temperatura óptima entre 20 y 25 °C, seguida por una incubación nocturna. En experimentos realizados se encontró que los tubos de germinación no se diferenciaron significativamente entre 20 y 25 °C pero a 13 y 27 °C solo fueron 1/2 a 1/3 de largo mientras que a 11.5 °C fueron apenas visibles. El crecimiento colonial óptimo fue de 23 a 24 °C, así mismo la germinación y crecimiento se redujeron arriba de 25 °C y se detuvo a 30 °C. La esporulación respondió a una temperatura más estrecha deteniéndose a 30 °C (7).

3.2.1.4. Ciclo biológico

El ciclo biológico del *V. lecanii* comprende dos fases: una patogénica y otra saprofitica. La fase de patogénesis ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo del huésped y la humedad en el microclima es del 85% o más (18).

El *V. lecanii* es parásito facultativo, el cual posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en **tres fases**: La **primera fase** de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula, intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa (18).

La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo. Esta relación se debe a factores muy concretos incluidos las diferencias cuticulares, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos pero para que se desarrollen siempre deben de estar afuera del agregado (18).

La **segunda fase** es la invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos. El *V. lecanii* produce metabolitos secundarios, como son: Ácidos Hidroxicarboxílicos, Ácido dipicolínico, Fenilalanina anhidra, 2,6 Dimetoxi-P-Benzoquinona, Aphidicolina, Ácido picolínico. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de las conidias en el tegumento (18).

Finalmente sigue la **tercera fase**, la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico (18).

El *V. lecanii* no es capaz de diseminarse rápida y efectivamente dentro de una población de insectos plaga puesto que las esporas están cubiertas de una mucosidad que no les permite ser volátiles. Claro está que cualquier insecto sano que entre en contacto con insectos conidiados serán infectados (18).

3.2.1.5. Dispersión de esporas e infección

V. lecanii es esparcido por el viento fácilmente, pero su muerte es rápida. Alternativamente *V. lecanii* puede ser dispersado en las plantas por insectos, la lluvia, el agua de riego (irrigación) y mamíferos que se mueven entre plantaciones. Su rápida dispersión y contagio depende de la ecología y las especies de insectos colonizados (7).

3.2.1.6. Producción y almacenamiento

La producción de conidias en agar es demasiado costoso y difícil de asegurar la pureza del cultivo. Alternativamente puede ser producido en sólidos granulados como el trigo por 5 a 6 días. La utilización de cultivos sumergidos de blastosporas es lo más económico produciendo 10^9 y 10^{11} blastosporas por gramo de sustrato en medio líquido. Las blastosporas de *V. lecanii* son menos estables que las conidias de otros tipos de hongos. *V. lecanii* almacenado a temperaturas entre 2 a 9 °C mantiene su poder insecticida durante por lo menos 12 meses. Puede ser afectado por temperaturas elevadas, a 27 °C el porcentaje de viabilidad presenta una caída equivalente al 50% de la población inicial a los 15 días. A 37°C la caída es vertiginosa desde el día 8 de almacenamiento (7, 18).

3.2.1.7. Seguridad del hombre y otros animales

V. lecanii no es tóxico para el hombre, animales domésticos, la flora y fauna. Este hongo no puede crecer a 37 °C por lo tanto la infección en humanos es remota. Estudios realizados con ratones a los cuales se les inoculó 10^6 conidias de C-3 no presentaron efectos secundarios. Las personas que han experimentado con el hongo no han presentado ninguna contraindicación, esto no quiere decir que no se tomen las precauciones al momento de su manipulación (utilizar equipo adecuado de aplicación, evítese la ingestión e inhalación, no fumar, comer o beber, lavarse el cuerpo, la ropa y el equipo después del trabajo) (7, 18).

3.2.1.8. Estudios realizados con *V. lecanii*

El entomopatógeno *V. lecanii* es un prospecto prometedor para el control de áfidos *Myzus persicae*, *M. samborni*, *Brachycaudus helychrysi*, *Aphis gosypii* y *A. fabae*, realizando aspersiones de 5×10^{07} blastosporas/ml. Los áfidos infestados sirven como una fuente adicional de inóculo y los conidios se dispersan muy bien en las condiciones de invernadero, también *V. lecanii* puede ser usado en viveros contra insectos y hongos fitopatógenos como por ejemplo la roya del café *Hemileia vastatrix* (7).

A temperatura fuera del invernadero, los parámetros críticos de temperatura y humedad no pueden ser controlados, siendo la mayoría de veces no favorable al hongo, excepto cuando el patógeno tenga un microclima. Aunque un lugar ideal son las zonas tropicales y subtropicales donde la humedad es alta por períodos largos. También el tratamiento con "spray" atomizado debe hacerse con cuidado ya que al no ser así puede infectarse subsecuentemente, no ocasionando ningún efecto (7).

Bal (2001) (4) aisló y realizó pruebas de patogenicidad con el hongo que causó la muerte de la mosca blanca en una parcela de tomate en el municipio de Zaragoza, Chimaltenango. Identificando a *V. lecanii* (Ness) como el hongo entomopatógeno causante de la muerte de las moscas blancas, además de acuerdo a las pruebas de patogenicidad realizadas determinó que la concentración 1×10^{08} esporas/ml fue la que causó la mayor mortalidad, así mismo encontró una tendencia directa entre dosis y porcentaje de mortalidad; a mayor dosis mayor mortalidad.

Cutzal (2001) (10) determinó la concentración letal del entomopatógeno *V. lecanii* bajo condiciones de laboratorio. Evaluando nueve concentraciones de conidios y determinó que las concentraciones 4.5×10^{15} y 3.6×10^{07} conidios/ml reportaron los más altos valores de mortalidad (87.39 y 92.23% respectivamente), así mismo determinó que la mortalidad de ninfas de mosca blanca alcanzó el 50% a los 6.9 días después de la inoculación. Concluyó que la $C_{L\ 50}$ sobre ninfas de mosca blanca fue de 1.29×10^{09} conidios/ml.

3.2.2. SUSTRATOS UTILIZADOS

3.2.2.1. ARROZ

Aspectos generales

El arroz *Oriza sativa* L. es el cereal más importante en el mundo, es el alimento básico de mayor ponderación para la mayor parte de la humanidad. Aparte de su empleo en la dieta diaria del hombre, el

arroz participa en la fabricación de alcohol, almidón, glucosa, ácido acético, vinagre, acetona, aceite, productos farmacéuticos, alimentos vitaminados, entre otros (2).

Así mismo la cáscara sirve como combustible y sus cenizas como abono. Actualmente la cáscara es utilizada también como alimento para aves y ganado menor, así como un sustrato para el cultivo de micromicetos y macromicetos comestibles. La paja del mismo puede servir como materia prima para la elaboración del papel (2).

Este cultivo es originario de la India de donde se extendió rápidamente hacia Asia, Grecia, Africa y posteriormente a América. La cosecha de éste grano integral se hace mediante varias actividades entre las cuales figuran: la siega, el agavillado, la trilla, el saneamiento del paddy (grano integral) (2).

Luego del proceso de tecnología por el que pasa el grano es por último aprovechado para la alimentación humana, para la elaboración de productos de transformación como bebidas alcohólicas fermentadas, fabricación de cerveza, fabricación de aceite y elaboración de almidón (2).

El INCAP (17), al realizar un análisis proximal al grano de arroz presentó los valores siguientes: Fibra cruda 7.2%, Proteína 11.1%, Carbohidratos 77.0%, Grasa 1.8% y humedad 12.0%.

3.2.2.2. MAIZ

Aspectos generales

Juntamente con el arroz y el trigo, el maíz, *Zea mays* L., es una de las tres gramíneas más cultivadas en el mundo. Sus granos sirven para la alimentación del hombre y de los animales. Su empleo en la industria es de diversa índole. Reducido a semolina el grano de maíz sirve para la confección de papillas; el almidón extraído también de los granos es usado en la preparación de maicena, galleta, cerveza, entre otros. Los gérmenes de maíz contienen aceites para la alimentación humana. Para la elaboración de margarinas, jabones, barnices, textiles artificiales, etc. Por último se puede cultivar maíz para utilizarlo como forraje verde o ensilaje para ganado bovino, caballar, caprino y porcino (20).

El rastrojo dejado luego de la recolección de las mazorcas muchas veces es utilizado como forraje para ganado, muchas otras se incorporan al suelo en la siguiente temporada de siembra y en otras ocasiones es amontonado y quemado. Los usos industriales del maíz son numerosos aunque pueden resumirse en: los de molienda, elmidonería y semolería (20).

En cuanto al análisis proximal del grano de maíz, el INCAP (17) presenta los siguientes valores: Fibra cruda 1.8%, Proteína 9.4%, Carbohidratos 74.4%, Grasa 4.5% y Humedad 10.6%.

3.2.2.3. COCO

Aspectos generales

El cocotero, *Cocos nucifera* L., se cultiva en las zonas tropicales y en algunas regiones subtropicales del mundo. El cocotero es un árbol rústico capaz de producir cosecha aún en condiciones primitivas de cultivo. Sin embargo, teniendo en cuenta su importancia económica, se han desarrollado prácticas de cultivo y técnicas para el establecimiento y mantenimiento adecuado de las plantaciones y para el procesamiento de los productos y subproductos (8).

Comúnmente se cultiva en grandes plantaciones comerciales y en pequeñas unidades de tipo familiar. Como árbol es muy apreciado, suministra al hombre leña para el fuego, madera y paja para sus casas, fibra y carbón para la industria, agua refrescante y pulpa jugosa de sus frutos, hasta pasta de copra para la alimentación humana. Por esto se le conoce el árbol de los cien usos (8).

La copra es el producto comercial que se obtiene del albumen seco del coco y es la materia prima para la fabricación de aceite, manteca, margarina y jabones finos de tocador. El subproducto que queda es la pasta de copra, esta es rica en proteínas y se emplea en la producción de alimentos concentrados para animales. Para obtener mejor calidad de copra, deben emplearse nueces maduras y no germinadas. Los cocos destinados a la preparación de copra se almacenan de una a cuatro semanas después de la recolección (8).

En cuanto al análisis proximal de la copra de coco, el INCAP (17) presenta los siguientes valores: Fibra cruda 4.0%, Proteína 7.0%, Carbohidratos 10.0%, Grasa 60.1% y Humedad 4.3%.

3.2.2.4. MANI O MANIA

Aspectos generales

La manía pertenece a la familia Leguminosae y género *Arachis*. La especie cultivada es *Arachis hipogaea* L. Esta comprende dos grupos principales de variedades: erectas y rastreras. Casi todas las variedades comerciales son de porte erecto. El período vegetativo difiere según las variedades y las condiciones climáticas. El maní es una planta herbácea anual cuyas semillas, que se encuentran en una vaina o cápsula de 2 a 7 cm de largo, son ligeramente redondeadas y comprimidas, con hilum puntiagudo,

tiene una testa mas o menos gruesa, algo reticulada, de color rojo claro o rojo oscuro, poseen dos cotiledones blancos de aspecto aceitoso (9).

La manía es una fuente importante de aceite vegetal y de proteínas, en las zonas tropicales y subtropicales. La planta se aprovecha para consumo en forma integral. Su follaje se utiliza como forraje fresco o ensilado. Las semillas se comen crudas, cocidas o tostadas o en gran variedad de confituras. Con un contenido de aceite y proteína de excelente calidad para la alimentación humana, la manía tiene un rendimiento en grano tres veces mayor que el del ajonjolí. Comparado con la soya, produce dos y media veces mas aceite. Si las semillas van a utilizarse en la industria de alimentos para la obtención de aceite y pasta no debe tratarse con insecticidas. La extracción del aceite se efectúa usando el método combinado de extracción con expulsor y con disolventes, o el prensado continuo por medio de expulsores (9).

El INCAP (17), al realizar un análisis proximal del grano de manía encontró los valores siguientes: Fibra cruda 3.3%, Proteína 25.8%, Carbohidratos 17.5%, Grasa 45.0% y Humedad 5.0%.

Se presenta un resumen con el análisis proximal de los sustratos considerados en la presente investigación (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Análisis proximal de los sustratos evaluados.

SUSTRATO	HUMEDAD (%)	PROTEINA (%)	GRASA (%)	CARBOHIDRATOS (%)	FIBRA CRUDA (%)
<i>Arroz</i>	12.0	11.1	1.8	77.0	7.2
<i>Maíz blanco</i>	10.6	9.4	4.5	74.4	1.8
<i>Albumen de coco (carnaza, copra)</i>	4.3	7.0	60.1	10.0	4.0
<i>Maní</i>	5.0	25.8	45.0	17.5	3.3

Fuente. Tabla de composición de pastos, forrajes y otros alimentos de Centro América. 1986. INCAP (17)

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar el efecto de siete sustratos sobre el crecimiento, desarrollo y esporulación del entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness) para su comercialización.

4.2. ESPECIFICOS

- 4.2.1.** Determinar el porcentaje de viabilidad del entomopatógeno en cada sustrato evaluado.
- 4.2.2.** Determinar la concentración de esporas del entomopatógeno por cada sustrato evaluado.
- 4.2.3.** Determinar la mayor Tasa Marginal de Retorno (TMR) de los tratamientos evaluados.

5. HIPOTESIS

Todos los sustratos a evaluar permitirán un buen crecimiento, desarrollo y esporulación del entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness), sin que éste pierda su viabilidad, y a su vez tendrán igual Tasa Marginal de Retorno (TMR).

6.- MATERIALES Y METODOS

6.1. LOCALIZACION DEL EXPERIMENTO

La investigación se realizó en el laboratorio de la Empresa Agrícola El Sol (30 calle 11-42 zona 12, ciudad de Guatemala), en las coordenadas Latitud Norte 14°35'58'' y Longitud Oeste 90°31'58'' y a una altitud de 1,502 msnm (16).

El laboratorio se encuentra implementado con las instalaciones, equipo y condiciones de luz (1,000 Lux), temperatura (24 °C), humedad (85%) y aislamiento adecuados.

6.2. TRATAMIENTOS

Consistió en la evaluación de cuatro sustratos y 3 combinaciones de éstos (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Tratamientos evaluados para la reproducción del entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	SUSTRATO NUTRITIVO	CLAVE	PROPORCION (g)
T₁ (Testigo)	Medio a base de Arroz	Ar.	250
T₂	Medio a base de Maní (manía, cacahuete)	Ma.	250
T₃	Medio a base de Albumen de coco (carnaza, copra)	Ac.	250
T₄	Medio a base de Maíz blanco molido	Mm.	250
T₅	Medio de Maíz blanco molido + Maní	Mm. + Ma.	125:125
T₆	Medio de Maní + albumen de coco	Ma. + Ac.	125:125
T₇	Medio de Maíz blanco molido + albumen de coco	Mm. + Ac.	125:125

6.3. TAMAÑO DE LA UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo compuesta por una bandeja plástica de 0.25 m de largo x 0.1 m de ancho x 0.15 m de alto, que contenía los sustratos evaluados más la concentración de esporas (1×10^9 esporas /ml) (**Figura 3**).

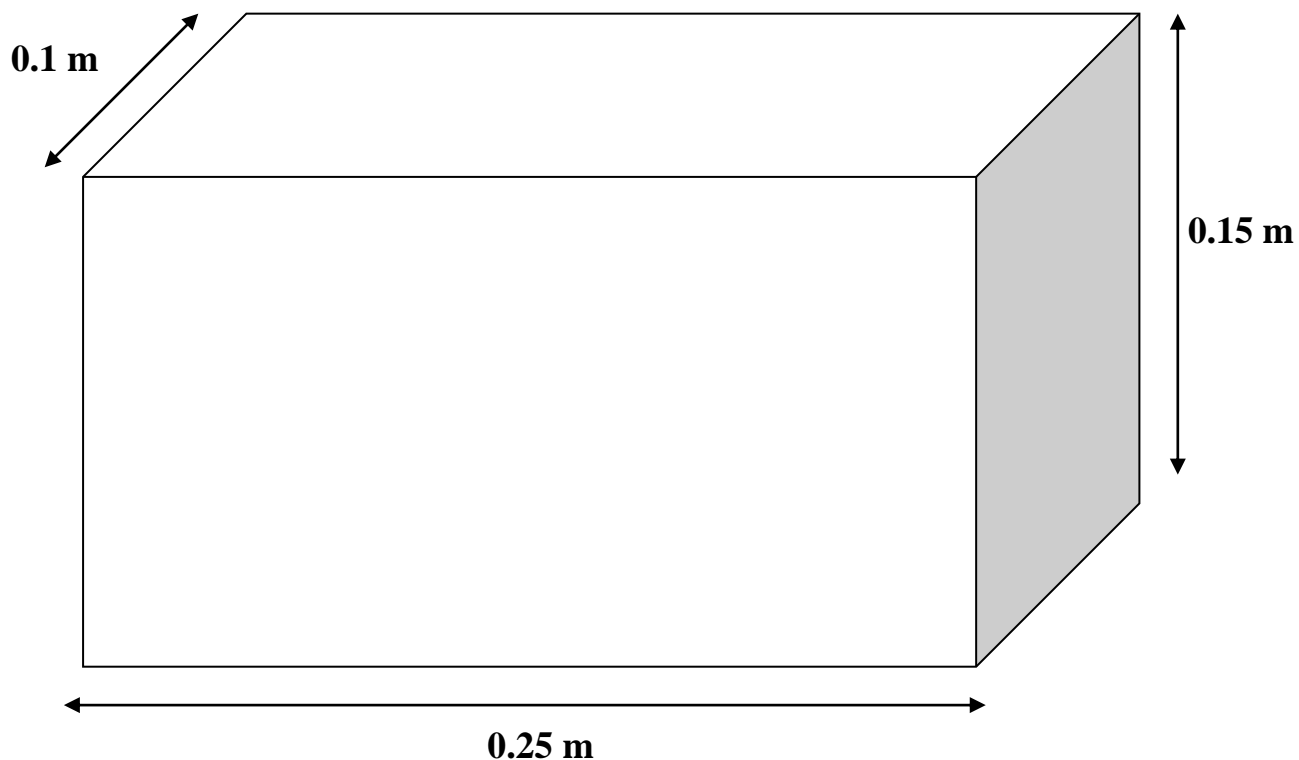


Figura 3. Forma y tamaño de la unidad experimental. Guatemala 2002.

6.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, compuesto de siete tratamientos y cuatro repeticiones, los cuales fueron aleatorizados respectivamente (**Figura 4**).

T ₂ R ₃	T ₃ R ₁	T ₁ R ₃	T ₄ R ₄
T ₃ R ₃	T ₄ R ₃	T ₅ R ₂	T ₂ R ₂
T ₅ R ₃	T ₂ R ₁	T ₃ R ₂	T ₄ R ₂
T ₁ R ₂	T ₄ R ₁	T ₇ R ₄	T ₇ R ₁
T ₆ R ₄	T ₇ R ₂	T ₁ R ₁	T ₆ R ₄
T ₅ R ₄	T ₆ R ₃	T ₆ R ₂	T ₁ R ₄
T ₇ R ₃	T ₂ R ₄	T ₅ R ₁	T ₃ R ₄

Figura 4. Distribución de los tratamientos sometidos a evaluación en la sala de crecimiento.

Guatemala 2002. *Ref.:* **T** = Tratamiento, **R** = Repetición.

6.5. MANEJO DEL EXPERIMENTO

6.5.1. Reproducción de esporas de inóculo

La cepa del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness) fue obtenida de la Empresa Agrícola El Sol y su reproducción fue la siguiente:

- A. Siguiendo la metodología de Cutzal (10), se utilizó el medio de cultivo: Agar sabouraud con extracto de levadura, por ser una fuente rica en proteínas, ya que propicia un buen crecimiento y desarrollo del hongo.
- B. En una campana de aislamiento, previa desinfección con alcohol etílico al 95%, se procedió a la siembra de *V. lecanii* (Ness) en el medio seleccionado (Agar sabouraud con extracto de levadura), de la siguiente manera: De la cepa original del hongo se tomó una muestra (50 g), utilizando para ello una aguja de disección, diluyéndose en 100 ml de agua estéril a la que se le agregó una solución Tween 20 al 0.02% (surfactante para romper la tensión superficial entre esporas), e inoculándose en el medio de cultivo y posteriormente se incubó bajo oscuridad durante 5 días a una temperatura de 25°C.

- C. Luego de la siembra se evaluaron los medios de cultivo, utilizando para ello un estereoscopio, seleccionándose aquellos en donde el porcentaje de germinación (presencia de micelio y esporas) de *V. lecanii* (Ness) fuera igual o mayor al 90%.
- D. Los medios de cultivo seleccionados fueron tomados en cuenta para la preparación de la concentración madre.

6.5.2. Preparación de los sustratos

- A. Se pesaron 2.0 kg de los sustratos a evaluar.
- B. Los sustratos Arroz (Testigo) y Maíz blanco se dejaron en remojo a temperatura ambiente por espacio de 24 horas. El sustrato Maní se tostó en un recipiente elaborado de arcilla (comal), posteriormente se procedió a eliminar la testa para dejar únicamente los cotiledones desnudos.
- C. Para el caso del arroz, utilizado para la producción comercial de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* (Metch), *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* (Ness) por ejemplo, y maíz blanco se realizó un tratamiento térmico el cual consistió en agregar (los sustratos) a agua en estado de ebullición (100 °C) permaneciendo por 10 minutos.
- C. La separación del arroz y maíz blanco del agua se realizó con un tamiz (14 mesh), facilitando su enfriamiento de forma manual por agitación con una paleta de madera.
- D. Los sustratos alubia de coco, maní y maíz blanco se molieron hasta dejar una granulometría de más o menos 2 mm.
- D. Ya preparados todos los sustratos se agregaron 250 gramos en el caso de los sustratos sin mezcla y 125 gramos con mezcla en las bandejas plásticas, esterilizándose en el autoclave durante 24 minutos a una temperatura entre 120 – 124 °C y una presión de 15 lb/p², dejándose enfriar y tapándose con papel aluminio esterilizado.

6.5.3. Determinación de la concentración de esporas

De los medios de cultivo seleccionados se tomaron esporas que se diluyeron en un litro de agua destilada estéril (solución madre) al que se le agregaron 20 gotas (1 ml) de Tween 20. El procedimiento para determinar la concentración de esporas a aplicar fue el siguiente:

- A. En una gradilla se colocaron 10 tubos de ensayo, conteniendo todos 9 ml de agua destilada estéril.
- B. De la solución madre se tomó 1 ml, utilizando una pipeta esterilizada, que se transfirió al primer tubo de ensayo, agitándose vigorosamente, obteniendo de esta manera una dilución 1×10^{-01} .
- C. Del tubo inicial se tomó 1 ml de la suspensión, transfiriéndose al segundo tubo de ensayo del cual se tomó una muestra que se colocó en la cámara de Neubauer y con la ayuda de un microscopio de luz (40X) y un hematócmetro se determinó la concentración de esporas/ml contenidas en la solución madre (1×10^{13}), para este caso se determinó la concentración de 1×10^{09} esporas/ml (dosis recomendada para el control de Homópteros y otros insectos chupadores (6)).
- D. Dado que la muestra contenía una alta concentración de esporas (1×10^{13}), se realizó otra dilución, agregando 1 ml del segundo tubo de ensayo al siguiente y así sucesivamente hasta obtener la concentración deseada (1×10^{09}).
- E. Para determinar la concentración de esporas/ml se utilizó la siguiente fórmula:

Concentración

de esporas/ml = No. de esporas $\times 1 \times 10^{-01} \times 1 \times 10^{-04} \times$ Volumen de la concentración madre en ml

De donde:

- a. **No. de esporas:** No. de esporas concentradas en la dilución.
- b. **1×10^{-01} :** Volumen que ocupa 1 ml de concentraciones de esporas en 9 ml de agua estéril.
- c. **1×10^{-04} :** Volumen estandar de esporas/ml que ocupa la caja de Neubauer.
- d. **Volumen de la concentración madre en ml:** 1000 ml

6.5.4. Siembra de esporas en los sustratos (Inoculación)

- A. Para realizar la siembra de esporas del hongo en los sustratos evaluados, se desinfectó toda el área de trabajo (mesas, estanterías, etc.) con alcohol etílico al 95%, para evitar contaminaciones.
- B. Obtenida la concentración de esporas de *V. lecanii* (1×10^{09}), se inocularon 40 ml de suspensión del hongo a cada uno de los sustratos en forma inyectada.
- C. El inóculo se dispersó en todo el sustrato contenido en cada bandeja plástica de cada tratamiento a través de agitación.
- D. Las bandejas inoculadas permanecieron por un período de 10 días en total oscuridad y a una temperatura de 24° C en preincubación para estimular la producción de esporas y micelio.
- E. Terminado el período de preincubación las bandejas se agitaron nuevamente para estimular una mayor producción de esporas y micelio. Finalmente fueron trasladadas a una sala de crecimiento en completa oscuridad y a temperatura ambiente, en donde permanecieron por espacio de 30 días.

6.5.5. Secado de los sustratos

- A. Transcurrido el período de incubación, se realizó el proceso de secado de los sustratos rayando diariamente cada uno de los mismos con una paleta de madera limpia, seca y esterilizada con alcohol al 95%. Esta actividad se llevó a cabo en un cuarto en donde la temperatura fue de 24 °C.
- B. Después de 8 días, el sustrato + hongo estuvieron lo suficientemente secos para realizar los procesos de evaluación y almacenamiento.

6.5.6. Evaluación de los sustratos

Terminado el proceso de secado se procedió a evaluar el crecimiento, desarrollo y esporulación del entomopatógeno *V. lecanii* en cada uno de los tratamientos, determinando la calidad del entomopatógeno mediante el porcentaje de viabilidad y la concentración esporas.

6.6. VARIABLES DE RESPUESTA

6.6.1. Porcentaje de viabilidad del entomopatógeno *V. lecanii* de cada uno de los sustratos

Para evaluar la viabilidad del hongo en cada uno de los sustratos se procedió a colocar 1 gramo de sustrato en un beacker (esterilizado) que contenía 25 ml de agua destilada estéril, agitándose con una espátula, a ésta suspensión se le agregó 5 gotas de Tween 20. Luego de haberse preparado la suspensión por cada tratamiento, se realizaron las siembras en el medio de cultivo Agar sabouraud con extracto de levadura, utilizando una pipeta esterilizada, aplicando de 2 - 3 gotas de suspensión las cuales se dispersaron en todo el medio de cultivo. Posteriormente se incubaron a temperatura de 25° C durante 48 horas. Luego se realizaron las lecturas de esporas germinadas (presencia de hifas) utilizando un microscopio de luz (40X) y un hematocímetro.

6.6.2. Concentración de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* de cada uno de los sustratos

Terminado el proceso de secado de los sustratos, en la sala de crecimiento se procedió a realizar la cuantificación de esporas. Inicialmente se pesó 1 gramo de sustrato en la balanza analítica, obtenido el peso, se agregó el sustrato a un beacker de 50 ml que contenía 25 ml de agua estéril + 10 gotas de Tween 20, posteriormente se aforó el beacker hasta 50 ml. Al mezclar el sustrato con la solución fue importante romper con una espátula todos los agregados existentes. De la solución se tomó 1 ml el cual se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua estéril, de aquí se tomó una muestra que se colocó en la caja de Neubauer y con la ayuda de un microscopio (40X) y un hematocímetro se procedió a realizar el conteo de esporas.

6.7. ANALISIS DE LA INFORMACION

6.7.1. Modelo estadístico

Se utilizó el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{IJ} = U + T_I + E_{IJ}$$

De donde:

Y_{IJ} = Variables de respuesta; porcentaje de viabilidad y concentración de esporas.

U = Media general.

T_I = Efecto del i-ésimo sustrato para el crecimiento fungoso.

E_{IJ} = Efecto del error experimental asociado a la ij-ésima bandeja plástica.

6.7.2. Análisis de varianza

Se efectuó un análisis de varianza para las variables: Porcentaje de viabilidad y concentración de esporas, realizando para ésta última una transformación logarítmica de datos, utilizando el paquete estadístico SAS.

6.7.3. Prueba de medias

Debido a que el análisis de varianza demostró diferencias estadísticas significativas para las dos variables evaluadas, se realizaron las pruebas de medias Tukey (5%) respectivas.

6.7.4.- Análisis económico

Se realizó con la finalidad de determinar cual de los tratamientos obtuvo la mayor rentabilidad, siguiendo la metodología descrita por Samayoa (29), que consiste inicialmente en elaborar un Presupuesto Parcial y un Análisis de Dominancia, para finalmente estimar la Tasa Marginal de Retorno (TMR).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Porcentaje de viabilidad del entomopatógeno *V. lecanii* de cada uno de los sustratos

Previo a realizar la aplicación de hongos entomopatógenos es necesario llevar a cabo una prueba de viabilidad (cantidad de esporas o conidios capaces de germinar, expresado en porcentaje) después del período de secamiento de un determinado sustrato, debido a que podría ocurrir durante éste proceso un descenso drástico de la viabilidad.

La temperatura del lugar de almacenamiento influye de gran manera en la conservación del poder infectivo del hongo *V. lecanii*, una vez incorporado a un sustrato debe almacenarse a temperaturas entre 2 – 9 °C para mantener su capacidad de infección durante por lo menos 12 meses. Por ser un microorganismo puede ser afectado por temperaturas elevadas. A 27 °C el porcentaje de viabilidad presenta una caída equivalente al 50% de la población inicial a los 15 días. A 37 °C la caída es mayor desde el día 8 de almacenamiento (18).

En el **Cuadro 13A** se presentan los resultados del porcentaje de viabilidad de esporas cada uno de los sustratos evaluados, de los cuales se obtuvo un promedio (**Cuadro 4**) para efectuar el analisis de varianza (ANDEVA) y determinar sí habia o no diferencias significativas entre los tratamientos (**Cuadro 5**).

Cuadro 4. Promedio de los resultados obtenidos de la variable viabilidad de esporas producidas. Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	VIABILIDAD DE ESPORAS (%)
<i>Arroz (Testigo)</i>	92.00
<i>Maní (manía, cacahuete)</i>	49.75
<i>Albumen de coco (carnaza, copra)</i>	90.25
<i>Maíz blanco molido</i>	40.00
<i>Maní + Maíz blanco molido</i>	86.50
<i>Maní + albumen de coco</i>	88.50
<i>Maíz blanco molido + albumen de coco</i>	90.75

Cuadro 5. Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de esporas del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Fc	Pr > F
<i>Tratamiento</i>	6	11693.8571	1948.9761	168.95	0.0001 *
<i>Error</i>	21	242.250000	11.535714	-	-
<i>Total</i>	27	11936.1071	-	-	-

* = Existe diferencia significativa el 5%

C.V. = 4.42 %

En los tratamientos evaluados existió diferencias estadísticas significativas, para determinar esas diferencias se efectuó la prueba múltiple de Tukey al 5%, y de ésta manera determinar los mejores tratamientos en cuanto a aumentar el porcentaje de viabilidad del entomopatógeno evaluado (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	Media	Tukey
<i>Arroz (Testigo)</i>	92.00	A
<i>Maíz blanco molido + albumen de coco</i>	90.75	A
<i>Albumen de coco (carnaz, copra)</i>	90.25	A
<i>Maní + albumen de coco</i>	88.50	A
<i>Maní + Maíz blanco molido</i>	86.50	A
<i>Maní (manía, cacahuate)</i>	49.75	B
<i>Maíz blanco molido</i>	40.00	C

El maní y el maíz blanco molido fueron los que presentaron, en ese orden, los valores más bajos de los siete sustratos evaluados, tal respuesta se debió posiblemente al hecho de que el sustrato maní posee un alto porcentaje de grasa (45%), que produjo dificultades al momento de molerlo, ya que el mismo tomó una consistencia pastosa con alto contenido de aceite, limitante para el crecimiento, desarrollo y esporulación del hongo entomopatógeno; mientras que el sustrato maíz blanco molido contiene un bajo porcentaje de proteínas (9.4%), condición adversa para *V. lecanii* ya que éste requiere de gran cantidad de proteínas para su desarrollo (10); condiciones que limitaron la viabilidad del entomopatógeno. Los restantes cinco sustratos y combinaciones de éstos tuvieron un rango de viabilidad de sus esporas entre 86.0 y 92.0 %, lo que indica que las esporas tuvieron una alta probabilidad de mantenerse viables en estos sustratos durante su período de secado para fines de almacenamiento o liberación en el campo definitivo bajo condiciones adecuadas.

Gráficamente se observó que el menor porcentaje promedio de esporas viables lo presentaron los sustratos maní y maíz blanco molido, mientras que los mayores porcentajes lo presentaron los cinco sustratos restantes y sus combinaciones (**Figura 5**).

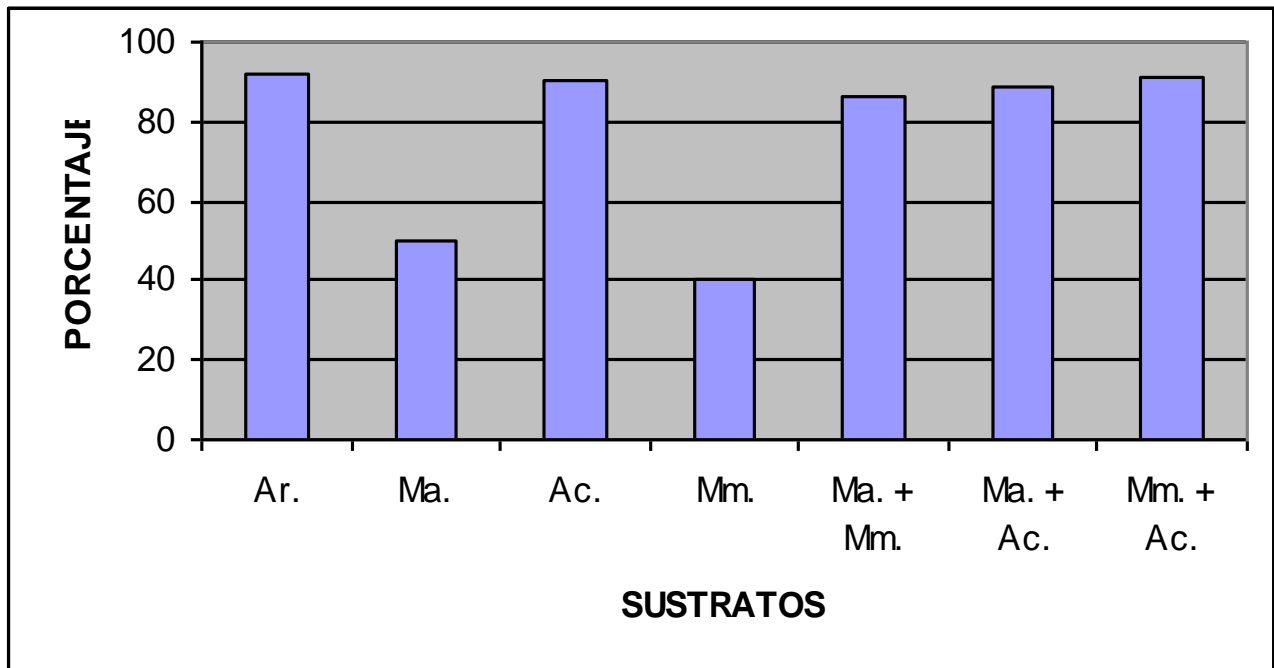


Figura 5. Porcentaje de esporas viables del entomopatógeno *V. lecanii* (Ness) producidos por cada sustrato evaluado. Guatemala 2002.

7.2. Concentración de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* de cada uno de los sustratos

Se realizó una cuantificación de esporas del entomopatógeno en cada uno de los sustratos (con el auxilio de una caja de Neubauer, un microscopio y un hematócmetro) con la finalidad de determinar cual o cuales de ellos permitieron producir la mayor cantidad promedio de esporas, pero debido al número elevado de esporas producidas se realizó una transformación logarítmica de los datos para disminuir el error en el análisis.

A los resultados obtenidos para la variable concentración de esporas (**Cuadro 14A**), se les realizó un promedio, haciendo la observación que los datos transformados fueron encerrados entre paréntesis (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Promedio de los resultados obtenidos de la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION DE ESPORAS EN 1 GRAMO DE SUSTRATO
<i>Arroz (Testigo)</i>	1.26115×10^{16} (35.013)
<i>Maní (manía, cacahuete)</i>	5.0175×10^{09} (21.363)
<i>Albumen de coco (carnaza, copra)</i>	1.42456×10^{17} (36.151)
<i>Maíz blanco molido</i>	5×10^{05} (12.826)
<i>Maní + Maíz blanco molido</i>	1.35488×10^{16} (35.483)
<i>Maní + albumen de coco</i>	2.66388×10^{15} (28.937)
<i>Maíz blanco molido + albumen de coco</i>	1.57221×10^{17} (37.263)

A los datos transformados se les efectuó un análisis de varianza (**Cuadro 8**), en el que se determinó que existieron diferencias estadísticas significativas sobre el efecto de los sustratos en la producción de esporas.

Cuadro 8. Análisis de varianza para la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Fc	Pr > F
<i>Tratamiento</i>	6	2096.295	232.921	10.09	0.0001 *
<i>Error</i>	21	415.499	23.083	-	-
<i>Total</i>	27	2511.795	-	-	-

* = Existe diferencia significativa el 5%

C.V. = 16.24 %

Debido a que existió diferencias estadísticas entre los tratamientos, se efectuó una prueba múltiple de medias Tukey para determinar el o los mejores sustratos para producir esporas (**Cuadro 9**).

Cuadro 9. Prueba de Tukey para la variable concentración de esporas del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	Media	Tukey
<i>Maíz blanco molido + albumen de coco</i>	37.263	A
<i>Albumen de coco (carnaza, copra)</i>	36.151	A
<i>Maní + maíz blanco molido</i>	35.438	A
<i>Arroz (Testigo)</i>	35.013	A
<i>Maní + albumen de coco</i>	28.937	B
<i>Maní (manía, cacahuate)</i>	21.363	B
<i>Maíz blanco molido</i>	12.826	C

El sustrato Maíz blanco molido + albumen de coco presentó el mayor número de esporas (1.57221×10^{17}) en relación al sustrato Maíz blanco molido que presentó el menor número (5×10^{05}), se asume que ésta diferencia se debió a que el sustrato maíz blanco molido + albumen de coco presentó de manera más estable el factor humedad, contrario a lo que ocurrió con el sustrato maíz blanco molido donde existieron descensos drásticos de humedad en períodos cortos de tiempo. En la siguiente gráfica se observa que la menor concentración promedio de esporas lo presentó el sustratos maíz blanco molido, seguido del sustrato maní (en orden ascendente), mientras que las mayores concentraciones lo presentaron los cinco sustratos restantes y sus combinaciones (**Figura 6**).

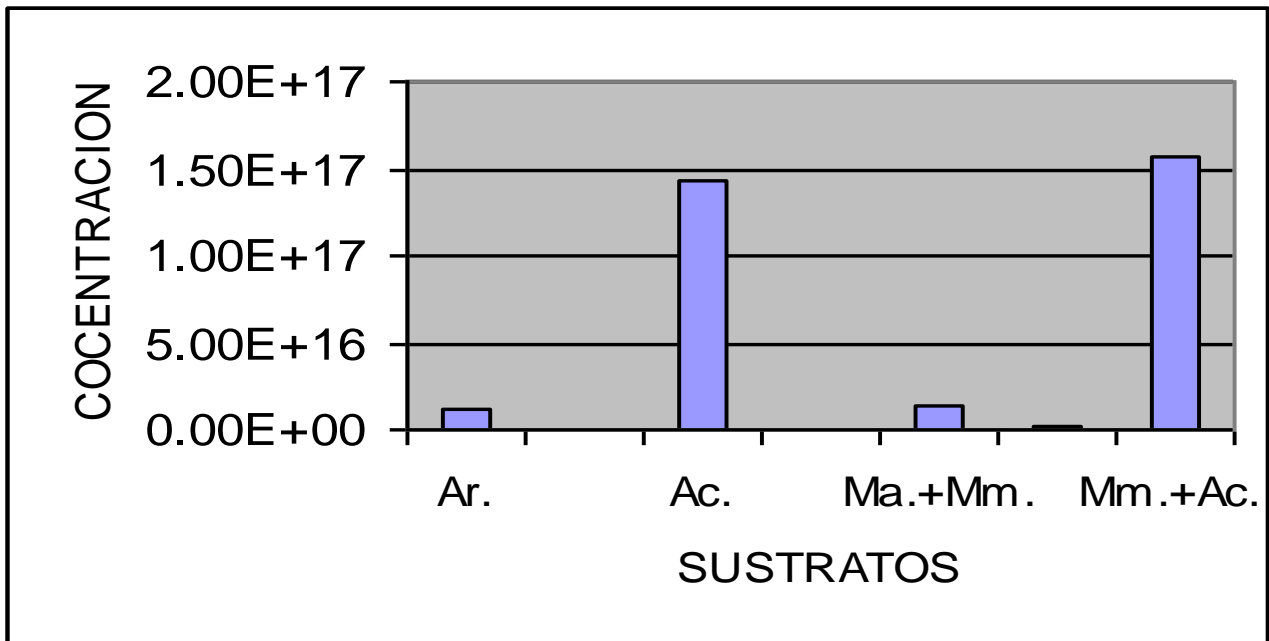


Figura 6. Concentración de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* producidas por cada sustrato evaluado. Guatemala 2002.

7.3. Análisis Económico:

Para determinar cual de los tratamientos proporcionó mayor beneficio económico para la producción del entomopatógeno a nivel de laboratorio, se elaboró un Presupuesto Parcial (**Cuadro 10**) y posteriormente un Análisis de Dominancia (**Cuadro 11**).

Cuadro 10. Análisis del presupuesto parcial de los tratamientos evaluados. Guatemala 2002.

CONCEPTO	TRATAMIENTOS						
	ARROZ (Testigo)	MANI (manía, cacahuate)	ALBUMEN DE COCO (carnaza, copra)	MAIZ BLANCO MOLIDO	MANI + MAIZ BLANCO MOLIDO	MANI + ALBUMEN DE COCO	MAIZ BLANCO MOLIDO + ALBUMEN DE COCO
<i>Rendimiento (kg)</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>No. de bolsas de 250 gramos (*)</i>	4	4	4	4	4	4	4
<i>Precio de venta (Q/bolsa) (**)</i>	100.00	50.00	100.00	40.00	87.50	87.50	100.00
INGRESO TOTAL (Q/kg)	400.00	200.00	400.00	160.00	350.00	350.00	400.00
<i>Costo del sustrato (Q/kg)</i>	7.70	6.60	9.50	3.30	4.95	8.05	6.40
<i>Costo de preparación (Q/kg)</i>	18.34	18.57	17.90	19.75	17.15	17.82	24.20
COSTO VARIABLE TOTAL (Q/kg)	26.04	25.17	27.40	23.05	22.10	25.87	30.60
BENEFICIO NETO (Q/KG)	373.96	174.83	372.60	136.95	327.90	324.13	369.4

(*) = Peso de sustrato que contiene una bolsa vendida en el mercado.

(**) = El precio por bolsa de 250 g está de acuerdo a la concentración de esporas y al porcentaje de viabilidad.

Cuadro 11. Análisis de dominancia para cada tratamiento evaluado. Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	BENEFICIOS NETOS (Q/kg)	COSTO VARIABLE (Q/kg)
<i>Arroz (Testigo)</i>	373.96	26.04 (ND)
<i>Albumen de coco (carnaza, copra)</i>	372.60	27.40 (D)
<i>Maíz blanco molido + Albumen de coco</i>	369.40	30.60 (D)
<i>Maní + Maíz blanco molido</i>	327.90	22.10 (ND)
<i>Maní + Albumen de coco</i>	324.13	25.87 (D)
<i>Maní (manía, cacahuete)</i>	174.83	25.17 (D)
<i>Maíz blanco molido</i>	136.95	23.05 (D)

En el análisis de dominancia se ordenaron los valores del Beneficio Neto de cada tratamiento de mayor a menor con su respectivo costo que varía, procediendo a comparar cada uno de los tratamientos determinando los dominados (D) y los no dominados (ND).

Posteriormente se efectuó la estimación del análisis marginal a través del cual se obtuvo la Tasa Marginal de Retorno para saber cuanto se esperaba ganar por cada quetzal invertido (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Tasa Marginal de Retorno para las condiciones no dominadas respecto a los sustratos utilizados para la reproducción del hongo entomopatógeno *V. lecanii* (Ness). Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	BENEFICIO NETO (Q/kg)	COSTO VARIABLE (Q/kg)	CAMBIO EN B.N. (Q/kg)	CAMBIO EN C.V. (Q/kg)	TMR
<i>Arroz (Testigo)</i>	373.96	26.04	46.05	3.94	1,168 %
<i>Maní + Maíz blanco molido</i>	327.90	22.10	-	-	-

La Tasa Marginal de Retorno más alta fue de 1,168 % misma que correspondió al sustrato Arroz (Testigo), lo cual indica que por cada quetzal que se invierta en el sustrato arroz como medio para la reproducción del entomopatógeno *V. lecanii* se espera recobrar ese mismo quetzal y adicionalmente Q 11.68 por cada kilogramo del sustrato.

8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento y con los tratamientos evaluados se concluye que:

- 1) La viabilidad del hongo entomopatógeno *V. lecanii* se favoreció con la utilización de los sustratos Arroz (Testigo), Maíz blanco molido + albumen de coco, Albumen de coco, Maní + albumen de coco y Maní + maíz blanco molido, ya que presentaron una alta viabilidad de esporas teniendo un rango entre 86 y 92 %, lo cual indica una alta probabilidad de mantenerse viables durante el período de almacenamiento.
- 2) Estadísticamente los siete sustratos evaluados permitieron el crecimiento, desarrollo y esporulación del entomopatógeno *V. lecanii*, pero el sustrato maíz blanco molido + albumen de coco (carnaza, copra) produjo la mayor concentración de esporas (1.57221×10^{17}) en relación al sustrato maíz blanco molido que presentó la menor concentración (5×10^{05}).
- 3) Económicamente el sustrato Arroz (Testigo) fue el mejor medio para la reproducción de *V. lecanii*, con una Tasa Marginal de Retorno de 1,168 %.

9.- RECOMENDACIONES

- 1) Para la reproducción del entomopatógeno *V. lecanii* se recomienda utilizar los sustratos Arroz y Maíz blanco molido + albumen de coco, ya que bajo las condiciones en las que se evaluaron presentaron la más alta viabilidad y concentración de esporas, respectivamente.
- 2) Económicamente se recomienda utilizar el sustrato Arroz para la producción masiva de esporas de *V. lecanii*, ya que se obtiene un Beneficio Neto de Q 373.96 por kilogramo de sustrato.
- 3) Con base a los resultados y a los análisis estadísticos practicados no se recomienda el uso de los sustratos Maíz blanco molido y Maní sin mezcla para la reproducción de *V. lecanii*, ya que presentaron la más baja viabilidad y concentración de esporas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. ALEMAN, M.; OVALLE, W. 1998. Producción y manejo del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metch) sor. Guatemala, CENGICAÑA. 18 p.
2. ARROZ. 1979. Mexico, Trillas. Manuales para la Educación Agropecuaria. 54 p.
3. BACH, P. DE. 1987. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Trad. Carlos Manuel Castaños. México, Continental. 949 p.
4. BAL SALAZAR, F.J. 2001. Aislamiento y pruebas de patogenicidad del hongo que causa la muerte de la mosca blanca (Homóptera: Aleyrodidae). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 61 p.
5. CARBALLO, M. 1998. Hongos entomopatógenos. Turrialba, Costa Rica. CATIE. p. 17-21.
6. CARBALLO, M.; HERRERA, F.; SHANNON, P. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) no. 54:37-43.
7. COOK, R.J. 1983. Microbial control of pests plant diseases. Inglaterra, Academic Press. p. 484-497.
8. CULTIVOS DE plantación. 1983. México, Trillas. Manuales para la Educación Agropecuaria. p. 81-102.
9. CULTIVOS OLEAGINOSOS. 1984. México, Trillas. Manuales para la Educación Agropecuaria. p. 49-58.
10. CUTZAL MIJANGOS, D.C. 2001. Determinación de la concentración letal del entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Ness), que causa la muerte de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.: Hom.: Aleyrodidae), bajo condiciones de laboratorio. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 43 p.
11. ENEMIGOS NATURALES; hongos entomopatógenos. 2002. (www.infoagro.com).
12. ESTADOS UNIDOS. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1978. Manejo y control de plagas de insectos. Trad. Modesto Rodríguez. 3 ed. México, Limusa. v. 2, 522 p.

13. ESTRADA H., R.E. 1981. Experiencias de control biológico en Guatemala. En: Curso Internacional de Control Integrado de Plagas (1981, Antigua Guatemala, Gua.). Guatemala, ICTA. v. 1, p. 128-142.-
14. GARZA G., E.; BERLANGA P., M. 1994. Biología, identificación y uso de hongos entomopatógenos. Tecomán, Colombia. Dirección General de Sanidad Vegetal. p. 2-10.
15. GARZA G., E.; HERNANDEZ V., V. 1994. Guía técnica de producción de hongos entomopatógenos. Tecomán, Colombia, Dirección General de Sanidad Vegetal. 10 p.
16. GUATEMALA. INSTITUTO GEOGRAFICO NACIONAL. 1976. Diccionario geográfico de Guatemala. 2 ed. Guatemala, Tipografía Nacional. Tomo 1, p. 2.
17. INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (Gua.). 1986. Tabla de composición de pastos, forrajes y otros alimentos de Centro América y Panamá. Guatemala. 150 p.
18. LAVERLAM; *Verticillium lecanii*. s.f. (www.laverlam.com.co/agricola.html).
19. MAGAÑA, S. DE 2001. Controles biológicos combaten plagas. Prensa Libre, Guatemala (Gua); Oct. 28:20.
20. MAIZ. 1978. México, Trillas. Manual para la Educación Agropecuaria. 48 p.
21. MARROQUIN V., C.A. 1984. Evaluación de rango de hospedantes, medios de cultivo, luz y temperatura para la reproducción masiva del entomopatógeno (*Metarhizium sp.*) in vitro. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 35 p.
22. MIER, T.; TORIELLO, C. 1995. Hongos microscópicos para el control de plagas agrícolas. INTECAP. 16 p.
23. MONZON, A.; BUSTAMANTE, E.; MONTERROSO, D. 1993. Incidencia de *Verticillium sp.* como hiperparásito de *Hemileia vastatrix* en tres zonas cafetaleras de Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) no. 30: 1-6.
24. MORALES M., V.M. 1990. Evaluación de seis sustratos para la reproducción de cinco cepas de hongos entomopatógenos y estudio de su patogenicidad en cuatro especies de insectos plaga. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario de Occidente, División de Ciencia y Tecnología, Carrera de Agronomía. 60 p.

25. POSADA, F.; VELEZ, P. 1997. Registro de hospedantes y aislamiento de *Beauveria bassiana* en la colección de hongos entomopatógenos de CENICAFE, Colombia. Manejo Integrado de Plagas. (C.R.) no. 46:50-64.
26. RODAS C., E.A. 1982. Evaluación de medios de cultivo para la reproducción masiva del entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 53 p.
27. RODRIGUEZ, A. 2000_a Efecto de la calidad del grano de arroz sobre la producción de *Metarhizium anisopliae* (METCH) Sorok, EN EL LABORATORIO.
([www.infoagro.go.cr/tecnologia/cana/EFFECTMetarhizium anisopliae.html](http://www.infoagro.go.cr/tecnologia/cana/EFFECTMetarhizium%20anisopliae.html).)
28. RODRIGUEZ, A. 2000_b Evaluación preliminar del maíz amarillo fraccionado como sustrato alternativo para la reproducción de *Metarhizium anisopliae* (METCH) Sorok.
([www.infoagro.go.cr/tecnologia/cana/evalmetarhizium anisopliae.html](http://www.infoagro.go.cr/tecnologia/cana/evalmetarhizium%20anisopliae.html).)
29. SAMAYOA, E. 1992. Análisis de rentabilidad y tasa marginal de retorno. Boletín Informativo AGRO. (Gua.). no. 4: 4 - 5.

11. APENDICE

Cuadro 13A. Porcentaje de viabilidad de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* (Ness) en los sustratos evaluados. Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	REPETICION	VIABILIDAD	MEDIA
1	1	94	
1	2	90	
1	3	93	
1	4	91	92.00
2	1	54	
2	2	48	
2	3	46	
2	4	51	49.75
3	1	91	
3	2	89	
3	3	93	
3	4	88	90.25
4	1	38	
4	2	41	
4	3	36	
4	4	45	40.00
5	1	90	
5	2	89	
5	3	78	
5	4	89	86.50
6	1	89	
6	2	91	
6	3	84	
6	4	90	88.50
7	1	89	
7	2	90	
7	3	91	
7	4	93	90.75

Cuadro 14A. Concentración de esporas del entomopatógeno *V. lecanii* (Ness) en los sustratos evaluados. Guatemala 2002.

TRATAMIENTO	REPETICION	CONCENTRACION	MEDIA
1	1	5.43×10^{14}	
1	2	4.89×10^{16}	
1	3	5.03×10^{14}	
1	4	5×10^{14}	1.2611×10^{16}
2	1	1.36×10^{09}	
2	2	2.1×10^{08}	
2	3	2.9×10^{09}	
2	4	1.56×10^{10}	5.0175×10^{09}
3	1	4.44×10^{15}	
3	2	4.89×10^{16}	
3	3	4.83×10^{14}	
3	4	5.16×10^{17}	1.4245×10^{17}
4	1	1.21×10^{06}	
4	2	3.21×10^{05}	
4	3	1.58×10^{05}	
4	4	3.11×10^{05}	5×10^{05}
5	1	4.89×10^{16}	
5	2	4.39×10^{15}	
5	3	4.16×10^{14}	
5	4	4.89×10^{14}	1.3548×10^{16}
6	1	9.98×10^{15}	
6	2	5×10^{05}	
6	3	6.05×10^{13}	
6	4	6.15×10^{14}	2.6638×10^{15}
7	1	4.83×10^{14}	
7	2	4.98×10^{15}	
7	3	6.23×10^{17}	
7	4	4.21×10^{14}	1.5722×10^{17}



Figura 7. Sustrato arroz conteniendo *V. lecanii* (Ness).

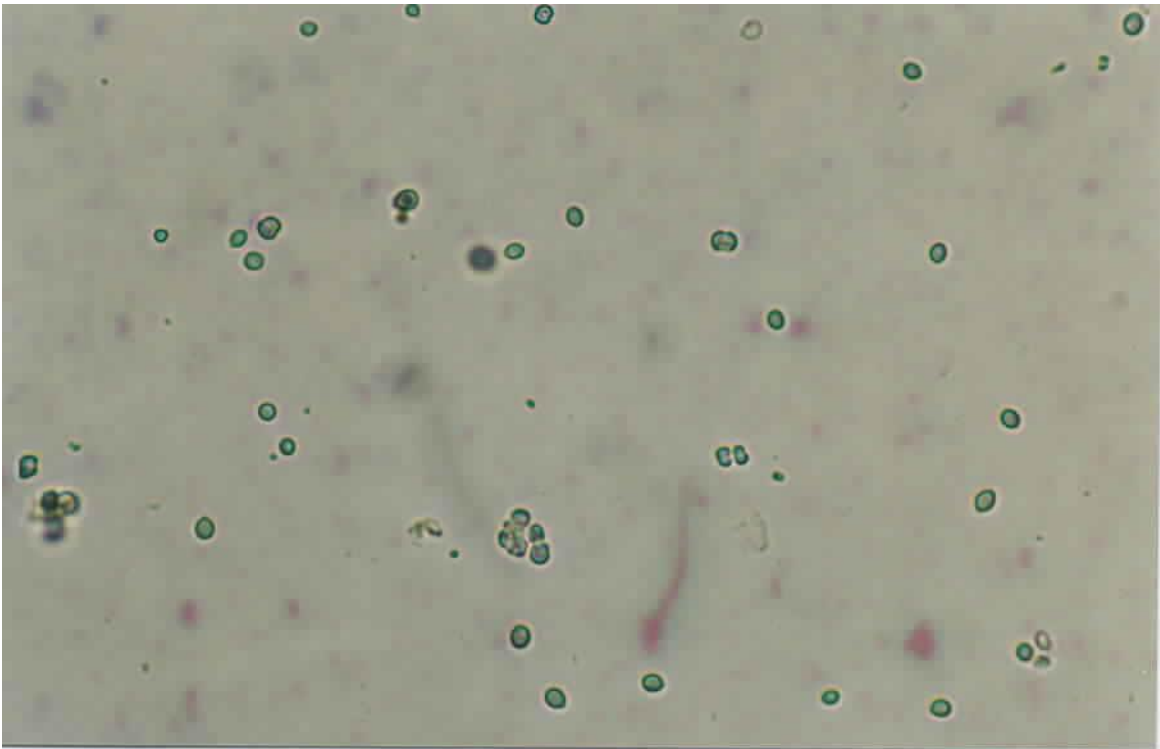


Figura 8. Esporas de *V. lecanii* (Ness).



Figura 9. Micelio y esporas *V. lecanii* (Ness).

RESULTADOS DE PRUEBAS ESTADISTICAS PROGRAMA SAS

Variable: Viabilidad de esporas

```

DATA TESIS;
TRAT  REP  VIAB;

1      1      94
1      2      90
1      3      93
1      4      91
2      1      54
2      2      48
2      3      46
2      4      51
3      1      91
3      2      89
3      3      93
3      4      88
4      1      38
4      2      41
4      3      36
4      4      45
5      1      90
5      2      89
5      3      78
5      4      89
6      1      89
6      2      91
6      3      84
6      4      90
7      1      89
7      2      90
7      3      91
7      4      93
    
```

The SAS System 08:59 Thursday, September 17, 1998

General Linear Models Procedure
 Class Level Information

Class	Levels	Values
REPT	4	1 2 3 4
TRAT	7	1 2 3 4 5 6 7

Number of observations in data set = 28

Dependent Variable: VIABILIDAD

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	11693.85714286	1948.97619048	168.95	0.0001
Error	21	242.25000000	11.53571429		
Total	27	11936.10714286			

R-Square	C.V.	Root MSE	VIABILIDAD MEDIA
0.979704	4.421197	3.39642669	76.82142857

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: VIABILIDAD

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 21 MSE= 11.53571
Critical Value of Studentized Range= 4.597
Minimum Significant Difference= 7.8072

Means with the same letter are not significantly different.

Table with 4 columns: Tukey Grouping, Mean, N, TRAT. It lists statistical results for different treatments, showing mean values and groupings (A, B, C).

Variable: Concentración de esporas

DATA TESIS;
INPUT TRAT REP CONCEN;
R=SQRT (CONCEN) ;
LC=LOG (CONCEN) ;
CARDS;

Table with 3 columns: ID, TRAT, CONCEN. It lists experimental data points for concentration of spores across different treatments and replicates.

```

RUN;
PROC UNIVARIATE NORMAL;
VAR CONCEN R LC;
RUN;
QUIT;
PROC ANOVA;
CLASS TRAT REP;
MODEL R LC=REP TRAT;
MEANS TRAT /TUKEY LINES;
RUN;

```

The SAS System 08:59 Thursday, September 17, 1998

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	7	1 2 3 4 5 6 7
REP	4	1 2 3 4

Number of observations in data set = 28

Dependent Variable: CONCENTRACION (DATOS TRANSFORMADOS)

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	2096.29526357	349.38243928	10.09	0.0001
Error	21	415.49983673	19.78570699		
Corrected	27	2511.79510030			
Total					

R-Square	C.V.	Root MSE	LC Mean
0.834581	16.24429	4.80451082	29.57660497

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable:CONCENTRACION
NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 21 MSE= 23.08332
Critical Value of Studentized Range= 4.673
Minimum Significant Difference= 11.226

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	37.263	4	7
A			
A	36.151	4	3
A			
A	35.483	4	5
A			
A	35.013	4	1
A			
B	28.937	4	6
B			
B	21.363	4	2
C			
C	12.826	4	4