

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a golden crown above, and two golden lions on either side. The shield is set against a blue background with a green base. The entire emblem is surrounded by a grey border containing the Latin text "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA CORBIS CONSPICUA CAROLINA".

TRABAJO DE GRADUACIÓN

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) Y SU CALIDAD DE ANTAGONISMO EN DIFERENTES CEPAS DE *Trichoderma* sp. PARA SU PRODUCCIÓN MASIVA. DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

YASMIN VÉLIZ DONIS

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) Y SU CALIDAD DE ANTAGONISMO EN DIFERENTES CEPAS DE *Trichoderma* sp. PARA SU PRODUCCIÓN MASIVA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

YASMIN VÉLIZ DONIS

**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERA AGRÓNOMA**

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2018

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Ing. M.Sc. Murphy Olympto Paiz Recinos

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godinez López
VOCAL I	Dr. Tomás Antonio Padilla Cámbara
VOCAL II	Ing. Agr. M. A. César Linneo García Contreras
VOCAL III	Ing. Agr. M.A. Jorge Mario Cabrera Madrid
VOCAL IV	P. en Electrónica Carlos Waldermar de León Samayoa
VOCAL V	P. Agr. Marvin Manolo Sicajau Pec
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2018

Guatemala, noviembre de 2018

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

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de graduación: Evaluación del rendimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y su calidad de antagonismo en diferentes cepas de *Trichoderma* sp. para su producción masiva, Ingenio Magdalena S.A., la Democracia, Escuintla, Guatemala, C.A., así como el diagnóstico y servicios realizados en el Departamento de Manejo Integrado de Plagas del Ingenio Magdalena, como requisito previo a optar el título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación me es grato suscribirme.

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Yasmin Véliz Donis.

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS Mi creador, quien siempre está a mi lado y ha llenado mi vida con muchas bendiciones.

MIS PADRES Leonel Feliciano Véliz Arias y Silvia Esperanza Donis Santos, que han sido los mejores padres, son lo más importante en mi vida, mi fuente de fortaleza, este logro también es suyo. Los Amo.

MIS HERMANOS Carlos y Stefany, les dedico este logro y así mismo quiero exhortarlos a que sueñen y que confíen en ustedes para lograr las metas que se propongan en su vida.

MIS MADRES Silvia Donis, que no sólo es mi madre sino también es mi mejor amiga. Mis tías Carmen Donis, Victoria Donis y Elizabeth Donis, que me vieron crecer toda mi vida, convirtiéndose en mis segundas madres. Carolina Moreno que me abrió las puertas de su hogar y me cuidó como a uno de sus hijos, las quiero con todo mi corazón, les deseo lo mejor del mundo y que Dios derrame bendiciones sobre ustedes.

MIS SUEGROS Julio César Paniagua Lemuz y Rosa Angélica Barillas González, por brindarme apoyo incondicional y abrirme las puertas de su hogar, los quiero mucho.

MI NOVIO Julio César Paniagua Barillas, porque eres mi mejor amigo, mi apoyo, mi extrema felicidad, este logro también es tuyo. Te Amo con todo mi corazón.

MI HIJO

Mateo Alexander Paniagua Véliz, te tuve en mi vientre y me hiciste la mujer más feliz del mundo, pero por alguna razón Dios te llevó con él. Te amo y siempre te amaré.

FAMILIA EN GENERAL

Tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas, por su presencia en este acto y apoyo hacia mi persona.

MIS PROFESORES

Porque durante mi estancia en la facultad me, compartieron sus conocimientos tanto dentro como fuera de las aulas, les agradezco su amistad y confianza, gracias por los consejos, aventuras y charlas amenas. Dios los bendiga.

MIS AMIGOS

A todos aquellos que Dios puso en mi camino y compartieron conmigo tanto las buenas como las malas y que han sido de influencia durante esta hermosa parte de mi vida, especialmente: Arlene Lima, Sofía Ruíz (China), Graciela Maldonado, Mónica Jiménez, Aroldo Yoc (Melón), David Chalí (Chalí), Fredy Cruz, Karla Chinchilla, Natalia Quixtán (Naty), José García Menéndez (Chepón), Rossembelh Ventura (Berns), Rocío Guzmán (Chío), Claudia Marroquín, Douglas Melinton, Jorge Ramírez (Gato bolsa), David Folgar (Len), José Bejarano, Ana Montejo, Jose Molina (Piña), Luis Fernando Barrios (Pumba), Miguel González (Mike), David Morales, Chirstian Barillas, Claudia de Izaguirre, Hugo Izaguirre, Ligia Monzón (Lichi), Katherine de León Cordón (Chupe), Edy Gilberto Pivaral (Cheje), Jose Luis González (Wicho), Abner Sagastume (Moje), Adriana Albizurez (Bea), Gabriela Guzmán (Gabita), Alejandro Rueda (Panzón), Manolo Murga, Gabriela Morales de la Roca, Alejandro González de la Cruz (Bruja), Miguel Armando Salazar (Cochito), Enrique Maldonado (Kike) y a todas aquellas personas con las que he compartido en algún momento, les agradezco por brindarme su amistad, les deseo muchos éxitos y que Dios los bendiga.

TERABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

DIOS.

MI FAMILIA.

MI PATRIA GUATEMALA, PAÍS DE LA ETERNA PRIMAVERA.

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

AGRADECIMIENTOS

Ingenio Magdalena, específicamente al Laboratorio de Microorganismos porque abrió las puertas y me dio la oportunidad de realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado (EPS).

Quiero agradecer al Ing. Agr. Álvaro Hernández por su valiosa asesoría y colaboración en la elaboración del presente documento, también agradezco por brindarme su apoyo, sus consejos, su confianza y en especial gracias por su amistad, que Dios lo bendiga.

Agradezco al Ing. Agr. Fernando Bracamonte por su supervisión profesional y ejecución del presente trabajo de investigación.

Quiero agradecer al Ing. Agr. José Miguel Lemus Grijalva e Ing. Agr. Gabriel Álvarez, que me brindaron asesoría y apoyo en mi proceso del Ejercicio Profesional Supervisado (EPS).

Agradezco a mis amigas del Laboratorio de Microorganismos, que de una u otra forma colaboraron en la elaboración de la presente investigación, también por brindarme su confianza, apoyo y especialmente su amistad y cariño, les deseo salud, sabiduría y éxitos en el resto de sus vidas.

Mis padres y familia en general por apoyarme en cada paso de mi vida personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
CAPÍTULO I	1
1.1 PRESENTACIÓN	3
1.2 MARCO REFERENCIAL	4
1.2.1 Descripción general del área	4
1.2.2 Ecología	4
1.2.3 Condiciones climáticas	4
1.2.4 Laboratorio de microorganismos	6
1.2.5 Proceso de producción de microorganismos	6
1.2.6 Normas de higiene y seguridad	12
1.3 OBJETIVOS	13
1.3.1 Objetivo General	13
1.3.2 Objetivos Específicos	13
1.4 METODOLOGÍA	13
1.4.1 Recolección de información	13
1.5 RESULTADOS	15
1.5.1 Propósitos del laboratorio de microorganismos	15
1.5.2 Estructura organizacional del laboratorio de microorganismos	15
1.5.3 Análisis FODA	16
1.6 CONCLUSIONES	19
1.7 RECOMENDACIONES	19
1.8 BIBLIOGRAFÍA	20
CAPÍTULO II	21
2.1 PRESENTACIÓN	23
2.2 MARCO TEÓRICO	24
2.2.1 Marco Conceptual	24
2.2.2 Marco referencial	44

	Página
2.3 OBJETIVOS.....	47
2.3.1 Objetivo General	47
2.3.2 Objetivos Específicos.....	47
2.4 HIPÓTESIS	47
2.5 METODOLOGÍA	48
2.5.1 Factor estudio	48
2.5.2 Tratamientos	48
2.5.3 Variables de respuesta.....	49
2.5.4 Unidad experimental	50
2.5.5 Manejo del experimento	51
2.5.6 Diseño experimental	57
2.5.7 Análisis de la información.....	58
2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
2.6.1 Concentración de cepas.....	60
2.6.2 Porcentaje de germinación o viabilidad.....	63
2.6.3 Grado de antagonismo.....	66
2.7 CONCLUSIONES	68
2.8 RECOMENDACIONES	69
2.9 BIBLIOGRAFÍA	70
CAPÍTULO III.....	77
ANEXO 1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA-TOLERANCIA INDUCIDA POR TRICHODERMA SP. A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS ABIÓTICOS EN LA CAÑA DE AZÚCAR (SACCHARUM SP. HIBRIDO).....	81
ANEXO 2. EVALUACIÓN DE CUATRO METODOLOGÍAS DE DILUCIÓN PARA EL CONTEO DE CONIDIAS EN EL HEMATOCÍMETRO O CÁMARA DE NEUBAUER APLICADO AL HONGO METARHIZIUM ANISOPLAE.....	109
ANEXO 3. EVALUACIÓN DE LA MORTANDAD Y PARASITISMO INDUCIDA POR BEAUVERIA BASSIANA CON DIFERENTES APLICACIONES AL BARRENADOR DEL TALLO EN CAÑA DE AZÚCAR (DIATRAEA SP.)	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Mapa de colindancias de la Finca San Patricio.....	5
Figura 2. A) Fotografía de bandeja con <i>Trichoderma harzianum</i> , B) Fotografía de bolsas de arroz.....	7
Figura 3. A) Fotografía de estructura microscópica de <i>Metarhizium anisopliae</i> , B) Fotografía de insecto atacado por <i>Metarhizium anisopliae</i>	8
Figura 4. Fotografía de estructura microscópica de <i>Beauveria bassiana</i>	9
Figura 5. Características microculturales de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	11
Figura 6. Fotografías de áreas restringidas del laboratorio.	12
Figura 7. Fotografía de características macroscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	29
Figura 8. Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	30
Figura 9. Dendograma de formas de reproducción de <i>Trichoderma</i> sp.	32
Figura 10. Diagrama del ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> sp.....	33
Figura 11. Mapa de ubicación geográfica de la finca San Patricio.	45
Figura 12. Mapa de colindancias de la finca San Patricio	46
Figura 13. Fotografía de una unidad experimental	51
Figura 14. Fotografía de las unidades experimentales.....	51
Figura 15. Fotografía de la disolución de la caja petri de <i>Trichoderma</i> sp.	52
Figura 16. Fotografía del inóculo de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	52
Figura 17. Fotografía de la inoculación de bolsas.	53
Figura 18. Fotografías de la identificación de bolsas (lado izquierdo) y de bolsas ordenadas en estantes (lado derecho).	53
Figura 19. Fotografía de la formación de micelio.	53
Figura 20. Proceso de diluciones.	55
Figura 21. Cámara de Neubauer o Hematocímetro	56
Figura 22. Siembra de esporas (lado izquierdo) y fotografía de la lectura del porcentaje de germinación o viabilidad en el microscopio (lado derecho).....	57

	Página
Figura 23. Colocación del patógeno y antagonista en caja petri.....	59
Figura 24. Gráfica de concentración de conidias para diferentes cepas evaluadas.	61
Figura 25. Gráfica del porcentaje de germinación o viabilidad.....	65
Figura 26. Fotografía de la medición del crecimiento micelial del patógeno y antagonista.	67
Figura 27. Gráfica de grado de antagonismo.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
Cuadro 1. Análisis FODA sobre el laboratorio de microorganismos.	16
Cuadro 2. Matriz FODA de forma analítica.	18
Cuadro 3. Resumen de la historia taxonómica del género <i>Trichoderma</i> sp.....	26
Cuadro 4. Cepas de <i>Trichoderma</i> sp. evaluadas, Ingenio Magdalena, 2017.....	48
Cuadro 5. Escala de capacidad antagónica in vitro.	50
Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA) de concentración de conidias por gramo para las diferentes cepas.	62
Cuadro 7. Prueba de medias de ScottKnott de concentración de conidias por gramo para las cepas.....	63
Cuadro 8. Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de germinación o viabilidad.	64
Cuadro 9. Prueba de ScottKnott para porcentaje de germinación o viabilidad.	64

TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS TÉCNICOS AGRÍCOLAS, ÁREA DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, INGENIO MAGDALENA, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

RESUMEN

El capítulo I presenta el diagnóstico de la situación actual del Laboratorio de Microorganismos del Departamento de Servicios Técnicos Agrícolas, Área de Manejo Integrado de Plagas, definiendo el funcionamiento del Laboratorio de microorganismos y presenten las principales problemáticas que existen.

El Capítulo II, expone la evaluación experimental del rendimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y su calidad de antagonismo en diferentes cepas de *Trichoderma* sp. para su producción masiva. Se realizó en el Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena, evaluando concentraciones de cepas de *Trichoderma* sp., mediante el porcentaje de germinación o viabilidad y grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari*. La cepa que obtuvo mejores resultados relacionados con la concentración de conidias por gramo, mayor porcentaje de germinación o viabilidad y mayor grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari* fue CG 14-18.

En el capítulo III está constituido por tres servicios. El primero la evaluación de la resistencia-tolerancia inducida por *Trichoderma* sp. a diferentes tipos de estrés abióticos en la caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido). El segundo la evaluación de cuatro diferentes metodologías de dilución para el conteo de conidias en el Hematocímetro o cámara de Neubauer aplicado al hongo *Metarhizium anisoplae*. El tercero es la evaluación de la mortalidad y parasitismo inducida por *Beauveria bassiana* con diferentes aplicaciones al barrenador del tallo de la caña de azúcar (*Diatraea* sp.).



CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO DE LA CONDICIÓN ACTUAL DEL LABORATORIO DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS TÉCNICOS AGRÍCOLAS, ÁREA DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA.

1.1 PRESENTACIÓN

El Ingenio Magdalena S.A. es una empresa productora de azúcar para exportación e investigación en caña de azúcar. Los procesos requieren de actividades eficientes para obtener buena producción en campo y fábrica, para lo cual la demanda de muchos recursos, unos podrían afectar la flora y fauna.

El Ingenio Magdalena S.A. desarrolló un enfoque ecológico en el cual promueve el manejo integrado de plagas. En el año 2008 comienzan a implementar la producción de microorganismos, que son utilizados para control biológico de plagas para el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). El Laboratorio de Microorganismos tiene una capacidad mínima de 45,000 dosis por temporada (marzo-octubre), con el fin de reducir la densidad poblacional y la utilización de plaguicidas, sin afectar la producción de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) de manera significativa, reduciendo costos de control de plagas.

Para llevar a cabo el diagnóstico se realizó un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) la cual se presentan en el Laboratorio de Microorganismos y por lo tanto se analizó de forma analítica, en la cual se realizan las siguientes estrategias: FO (Fortalezas y Oportunidades), FA (Fortalezas y Amenazas), DO (Debilidades y Oportunidades), DA (Debilidades y Amenazas). Por ejemplo la estrategia FO quiere decir que se une una fortaleza con una oportunidad, la estrategia FA es la unión de una Fortaleza con una Amenaza y así sucesivamente con el resto de las estrategias. El propósito principal es obtener un 5 a 10 % de contaminación por otros hongos como: *Aspergillus*, *Penicilium* etc., en el lapso de producción de *Metarizhium anisoplae*.

El presente diagnóstico fue realizado en el Laboratorio de Microorganismos, el cual forma parte del área de Manejo Integrado de Plagas, del Departamento de Servicios Técnicos Agrícolas del Ingenio Magdalena S.A., ubicado en la Democracia, Departamento de Escuintla.

1.2 MARCO REFERENCIAL

1.2.1 Descripción general del área

El Laboratorio de Microorganismos pertenece al Departamento de Servicios Técnicos Agrícolas, Área de Manejo Integrado de Plagas (MIP), se encuentra ubicado en la Finca san Patricio, en el Municipio de la Democracia, Escuintla a 106 kilómetros de la ciudad capital de Guatemala.

El laboratorio está ubicado al Norte de la finca Santa Cristina y Quien Sabe, al Sur de la Finca Las Ilusiones, Santa Mónica y Santa Elisa, al Oeste de la Finca Santa Ricarda y Buganvilia y al Este con la Finca La Flor (Figura 1) (Del Cid, 2011).

1.2.2 Ecología

De acuerdo a la clasificación ecológica de Holdridge, se encuentra dentro de la zona de vida subtropical cálida. Está caracterizada por una precipitación de 1700 mm y una temperatura promedio de 27.01 °C. Está ubicada en la Llanura costera del pacifico, abanico aluvial de los ríos Achíguate y Acomé (Del Cid, 2011).

1.2.3 Condiciones climáticas

El clima de la región, según INSIVUMEH (Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología de Guatemala), presenta las características siguientes: Época seca de diciembre a abril, época húmeda de mayo a noviembre, temperaturas máximas en marzo y abril, mínimas en diciembre y enero (Del Cid, 2011).



Fuente. Laboratorio de Microorganismos
Figura 1. Mapa de colindancias de la Finca San Patricio.

1.2.4 Laboratorio de microorganismos

Este laboratorio identifica y aísla cepas virulentas de microorganismos que afecten a las plagas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), para producirlas masivamente y distribuir las en las fincas de producción como parte de un programa control de plagas, además de comercializar los excedentes entre los clientes que están interesados en la implementación del programa, también minimizan el uso de pesticidas que además de generar costo causan un daño al ambiente.

1.2.5 Proceso de producción de microorganismos

Se producen masivamente los microorganismos:

- *Metarhizium anisoplae*
- *Paecilomyces sp.*
- *Trichoderma sp.*
- *Beauveria bassiana*

Los procesos necesarios para la producción masiva de microorganismos son:

- A. Revigorización de la cepa seleccionada en el hospedero específico para cada uno; *Metarhizium* para Chinche salivosa, *Trichoderma* para hongos radiculares, *Beauveria* para Barrenador (*Diatraea crambidoides*).
- B. Aislamiento de las estructuras reproductivas producidas en el hospedero.
- C. Multiplicación del micelio en medios de cultivo, máximo 3 ciclos.
- D. Dilución de estructuras reproductivas luego del tercer ciclo en matrices con solución dispersante específica para cada microorganismo.

- E. Agitación de matrices por 72 horas a 160 rpm.
- F. Siembra de inóculo en sustrato sólido.
- G. Desarrollo de micelio en sustratos sólido.
- H. Secado del sustrato a humedad del 15 %
- I. Almacenamiento.
- J. Control de calidad.



Fuente. Laboratorio de microorganismos
Figura 2. A) Fotografía de bandeja con *Trichoderma harzianum*,
B) Fotografía de bolsas de arroz.

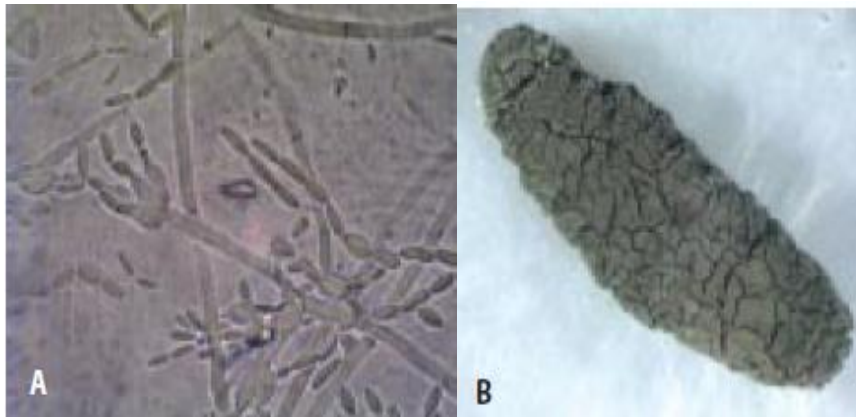
1.2.5.1 *Metarhizium anisoplae*

Colonia: pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento. Revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino (figura 3. B) (Cañedo & Ames, 2004).

Conidióforo: Nace del micelio y es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada septa. De 4 a 14 μ de longitud por 1.5 a 2.5 μ de diámetro (Figura 3. A) (Cañedo & Ames, 2004).

Fiálides: Cilíndricos en forma de clava, adelgazados en el ápice. Miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro (Figura 3. A) (Cañedo & Ames, 2004).

Conidias: Unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μ de longitud por 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Cañedo & Ames, 2004).



Fuente. Laboratorio de microorganismos

Figura 3. A) Fotografía de estructura microscópica de *Metarhizium anisopliae*, B) Fotografía de insecto atacado por *Metarhizium anisopliae*.

1.2.5.2 *Beauveria bassiana*

Colonia: La colonia en PDA (Potato Dextrose Agar), a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca. A medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillento, cremoso. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor (Cañedo & Ames, 2004).

Conidióforos: De 1 a 2 μ de diámetro donde nacen células conidiógenas en grupos grandes (Figura 4) (Cañedo & Ames, 2004).

Células conidiógenas (c.cs.): Formando grupos compactos grandes y a veces solitarios, en forma de botellitas de 3 a 6 μ por 3 a 5 μ . En ciertos casos, las células conidiogénicas se ramifican formando células conidiogénicas secundarias, al final se forma un raquis que sostiene los conidios (Figura 4) (Cañedo & Ames, 2004).

Raquis: Hasta de 20 μ de longitud y 1 μ de diámetro, denticulado, que sostiene una conidia en cada dentícula (Cañedo & Ames, 2004).

Conidias: Hialinas, globosas a subglobosas, de 2 a 3 μ por 2 a 2.3 μ que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Cañedo & Ames, 2004).



Fuente. (Cañedo & Ames, 2004)

Figura 4. Fotografía de estructura microscópica de *Beauveria bassiana*

1.2.5.3 *Trichoderma harzianum* Rifai

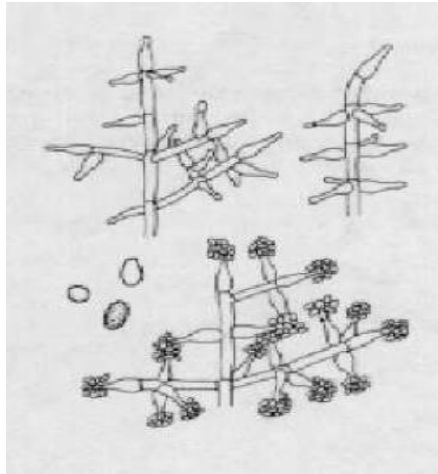
Colonias de rápido crecimiento en PDA, de 7 a 9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta 8 mm de diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril.

Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas. Pocos aislados producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso, hifas hialinas, clamidosporas abundantes, solitarias, subhialinas a amarillo pálido o carmelitoso con la edad, subglobosas a elipsoidales o piriformes (Elósegui Claro, 2006).

Conidioforos hialinos, paredes lisas, rectos o doblados, muy ramificados, primeras ramas nacen formando ángulos rectos o dobladas un poco hacia el ápice, en grupos de 2 o 3 que se vuelven más largos hacia la base, complejos con ramas secundarias en grupos de 2 a 4, la estructura completa es más o menos piramidal con un ápice estéril cuando está creciendo aún el hongo (Figura 5) (Elósegui Claro, 2006).

La conidiación comienza por la base de este patrón de conidióforo y las ramas jóvenes son estériles. Fiálides ampuliformes a subglobosas; muy constreñidas en la base, muy hinchadas en el medio y abruptamente estrechas en el ápice en número hasta de 6 (Elósegui Claro, 2006).

Conidios subglobosos a ovoides o ligeramente elipsoidales con ápice ampliamente redondeado, pared lisa o ligeramente rugosa, subhialinos a verde pálido (Elósegui Claro, 2006).



Fuente. (Cañedo & Ames, 2004)

Figura 5. Características microculturales de *Trichoderma harzianum* Rifai.

1.2.5.4 *Paecilomyces fumosoroseus*

Colonias en medio MEA (Malt Extract Agar) o PDA (Potato Dextrose Agar) crecen moderadamente rápido, muchas veces la colonia basalmente tiene aspecto de fieltro o polvoriento, granular. Producen coremios definidos que son polvorientos cuando el hongo es aislado por primera vez. Al principio blancas, que pueden permanecer así o cambiar con el tiempo a tonalidades rosadas y grisáceas. Algunas veces se produce un micelio aéreo anaranjado-amarillo, velloso. Al reverso son incoloras o amarillo pálido o anaranjado pálido. No tiene olor ni exuda. Sobre insectos produce conidióforos simples mononematosos y sinemas poco "apretados". Hifas vegetativas hialinas, de paredes lisas (Elósegui Claro, 2006).

Las estructuras conidiales tienden a ser complejas con conidioforos erectos que se originan de hifas aéreas. Los conidioforos se producen solo o en grupos, de paredes lisas, hialinas, con verticilos ramificados con grupos de 3 a 6 fiálides. Algunas veces el patrón verticilado se rompe y sobre el conidioforo se producen ramas sencillas. Fiálides con una base ancha que se adelgaza a un cuello delgado y largo. Conidios cilíndricos a fusiformes, con extremos redondeados, lisos, hialinos, en cadenas (Elósegui Claro, 2006).

1.2.5.5 *Paecilomyces lilacinus*

Colonias en medio MEA (Malt Extract Agar) o PDA (Potato Dextrose Agar) con tonalidades violáceas; al reverso incoloro o vináceo. Conidioforos erectos, mayormente solitarios del micelio horizontal, raramente sinematoso, amarillo a púrpura, paredes rugosas con fiálides agrupadas densamente. Conidios fusiformes a elipsoidales, paredes lisas a suavemente. Puede producir conidioforos mononematosos o sinemas en insectos. Es un hongo típico de suelo. Tiene alguna actividad antagonista contra bacterias y hongos. Producen el antibiótico peptídico leucinostatina, efectivo contra un amplio rango de hongos y bacterias Gram positivas y también el lilacinum (Elósegui Claro, 2006).

1.2.6 Normas de higiene y seguridad

Para evitar la contaminación tanto en el laboratorio como en invernaderos, es necesario mantener programas de asepsia estrictos para evitar la pérdida de material.

En cada departamento se encuentran estructuras diseñadas especialmente para prevenir el ingreso de sustancias u organismos que puedan afectar el desarrollo de los procesos productivos.



Fuente. Laboratorio de microorganismos

Figura 6. Fotografías de áreas restringidas del laboratorio.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Conocer las condiciones actuales del laboratorio de microorganismos, del Ingenio Magdalena S.A. Municipio la Democracia, Escuintla, Guatemala C.A.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar los microorganismos que actualmente producen en el laboratorio de microorganismos y la importancia de cada uno de ellos.
2. Describir el control preventivo de contaminación utilizado dentro del laboratorio de microorganismos.
3. Identificar los problemas que han afectado dentro del laboratorio de microorganismos para la producción de *Metarhizium anisoplae*.

1.4 METODOLOGÍA

1.4.1 Recolección de información

1.4.1.1 Definición del estudio

Se realizó el diagnóstico en el Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena S.A. ubicado en la Finca San Patricio, La Democracia, Escuintla.

1.4.1.2 Tiempo y espacio

Fue realizado durante 10 meses, comprendido de agosto 2016 a mayo 2017; la información obtenida se analizó y documentó en el Departamento de Servicios Técnicos Agrícolas del Ingenio Magdalena.

1.4.1.3 Observación y entrevistas

Para conocer la infraestructura y las actividades que se realizan dentro del laboratorio de microorganismos se utilizó la técnica de observación y entrevistas, identificando los microorganismos que manejaban dentro del laboratorio; también se pudo conocer las condiciones de dicho laboratorio, en la cual se identificó la problemática existente dentro del mismo y la determinación de las causas y efectos. Se consultaron normas del laboratorio, se conocieron los requisitos que se requieren para prevenir la contaminación en el área las cuales dan a conocer las restricciones de ingreso, se identificaron las acciones que se llevan a cabo para determinar el grado de contaminación de las salas del laboratorio y las acciones que realizan para reducir dicha contaminación.

1.4.1.4 Análisis de la información

Se realizó un análisis de la información obtenida por fuentes secundarias (revisión bibliográfica) sobre las consideraciones básicas para un establecimiento y el manejo de un laboratorio de microorganismos, analizando aspectos en cuanto a la organización y distribución de áreas y las actividades realizadas dentro del laboratorio y se llevó a cabo un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) de la información obtenida. Este análisis fue realizado en cuatro pasos:

- Análisis externo
- Análisis interno
- Confección de la matriz FODA
- Determinación de la estrategia a emplear.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Propósitos del laboratorio de microorganismos

- Obtener un 5 a 10 % de contaminación por otros hongos como: *aspergillus*, *penicilium* etc., en el lapso de producción de *Metarhizium anisoplae*.
- Asegurar la calidad de *Metarhizium anisoplae* obtenida a través de la revigorización del hongo.
- La tasa de producción de otros hongos como: *Trichoderma sp.*, *Beauveria bassiana* es de un 30 % y se desea incrementar un 20 %.
- Asegurar la calidad del hongo obtenidas a través de los conteos de conidias.
- Realizar ensayos en campo para evaluar la eficiencia de cada uno de los microorganismos producidos.

1.5.2 Estructura organizacional del laboratorio de microorganismos

Anteriormente el laboratorio era llamado: Laboratorio de producción de hongos entomopatógenos, formaba parte del departamento de BioMAG del área de Investigación. Actualmente el laboratorio es llamado: Laboratorio de Microorganismos, forma parte del departamento de Servicios Técnicos Agrícolas del Ingenio Magdalena, este departamento se encuentra en el área de Manejo Integrado de Plagas.

1.5.3 Análisis FODA

En base a los datos recopilados de las entrevistas, se realizó el análisis FODA del laboratorio de hongos entomopatógenos (Cuadro 1) para conocer la condición actual del laboratorio y su entorno en la cual muestra las Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas que afectan el desarrollo de las actividades

Cuadro 1. Análisis FODA sobre el laboratorio de microorganismos.

FORTALEZAS	DEBILIDADES
<ul style="list-style-type: none"> • Personal con experiencia para la producción de microorganismos, teniendo control de la asepsia, esterilización, revigorización, inoculación, salas de desarrollo del mismo, secado del sustrato y preparación de medios de cultivo. • Manejo estricto sobre las normas asepsia internas, esto para evitar la contaminación en las áreas de trabajo y no afectar la producción. • El laboratorio cuenta con equipo adecuado para la producción de microorganismos. • Implementación de nuevas metodologías de producción de microorganismos. • El laboratorio pertenece a una empresa con solidez y prestigio, tanto nacional como internacional. 	<ul style="list-style-type: none"> • En las salas de desarrollo tienen constantemente fallas los aires acondicionados por lo que esto incrementa la contaminación de las bolsas de hongo producido. • Aumento de descarte de bolsas con hongo producido, esto debido a la alta contaminación de las salas, ya que en el ambiente y en las herramientas se queda impregnado los hongos contaminantes y son muy difíciles de expulsar. • Daños en la infraestructura provocados por fenómenos climáticos mayormente en invierno. • Falta de mantenimiento, debido a esto ingresan plagas como ratas, serpientes etc., ya que dañan el producto producido y lo contaminan
OPORTUNIDADES	AMENAZAS
<ul style="list-style-type: none"> • Realización de investigaciones para el mejoramiento del proceso. • Existe la asesoría de investigadores internacionales expertos en la producción de microorganismos para implementar nuevas metodologías para la producción de hongos. • Planificación de futura ampliación del laboratorio. • El hongo <i>Metarhizium anisoplae</i> ha sido caracterizado como líder para ser utilizado como controlador biológico de la chinche salivosa. • Diversidad de organismos benéficos en el área, ya que las regiones de la Costa Sur presentan gran diversidad de fauna lo que promueve el control biológico natural en ciertas áreas del ingenio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de fauna benéfica nativa por la utilización excesiva de productos químicos de amplio espectro y el cambio de uso de la tierra lo que provoca degradación de ambientes nativos. • Reducción de presupuesto para el laboratorio de microorganismos. • Pérdida de mano de obra calificada para la producción de microorganismos. • Pérdida de interés en los microorganismos biológicos. • Expansión de otros laboratorios productores de microorganismos biológicos.

1.5.3.1 Análisis de la matriz FODA, de forma analítica

A. Estrategia FO:

El laboratorio cuenta con personal capacitado, instalaciones y equipo adecuado para el mejoramiento de la producción realizada, además con la futura ampliación del laboratorio, dará la oportunidad de analizar gran diversidad de organismos benéficos en el área, ya que las regiones de la Costa Sur presentan gran diversidad de fauna lo que promueve el control biológico natural en ciertas áreas del ingenio.

B. Estrategia FA:

Con la implementación de nuevas metodologías de producción, la empresa será más competente en cuanto a otras productoras de microorganismos biológicos.

C. Estrategia DO:

El aumento de descarte de bolsas contaminadas de hongo producido debido a que en el ambiente de las salas de desarrollo y en las herramientas se quedan impregnado los hongos contaminantes y son muy difíciles de expulsar; por la cual existe la oportunidad de obtener la asesoría de investigadores internacionales expertos en la producción de microorganismos para implementar nuevas metodologías para la producción del mismo.

A. Estrategia DA:

Mejorar los daños en la infraestructura del laboratorio provocados por fenómenos climáticos mayormente en invierno, por otro lado la mano de obra calificada para la

producción de microorganismos es primordial para la obtención de buenos resultados y con esto será posible disminuir el porcentaje de bolsas contaminadas de producto.

Lo descrito se muestra en la matriz FODA de forma analítica (Cuadro 2), recomendando decisiones estratégicas para el aprovechamiento de las Fortalezas y Oportunidades y reduciendo las Amenazas y Debilidades.

Cuadro 2. Matriz FODA de forma analítica.

Factores internos Factores externos	FORTALEZAS	DEBILIDADES
OPORTUNIDADES	<ul style="list-style-type: none"> • Aprovechar los recursos disponibles para el mejoramiento de los procesos realizados. • Aumentar la producción de microorganismos biológicos, abarcando en mayor grado la demanda del mercado. • Obtener nuevas tecnologías y la realización de investigaciones para validar los procesos existentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adquirir nuevas tecnologías para el mejoramiento de área deficientes en control de calidad. • Mantener el área de trabajo y las herramientas en buen estado. • Realizar mantenimiento al equipo en uso, para que tenga un mayor tiempo de vida
AMENAZAS	<ul style="list-style-type: none"> • Mejorar el grado de competencia en cuanto a otras productoras de microorganismos biológicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Generar más interés en los agricultores para utilizar microorganismos benéficos. • Capacitar a los trabajadores con nuevas metodologías de producción de microorganismos.

1.6 CONCLUSIONES

1. Los hongos que se manejan actualmente son *Metarhizium anisoplae*, *Paecilomyces sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*.
2. El control preventivo que se maneja dentro del laboratorio para disminuir la contaminación es primordialmente el seguimiento de las normas establecidas durante los procesos de trabajo, evitando así el riesgo de contaminación.
3. Los problemas que se identificaron en el laboratorio de hongos es la contaminación por otros hongos contaminante, esto debido al aumento de temperatura causada por el aire acondicionado, el incremento de humedad causada por la época lluviosa, también por el ingreso de plagas a las salas de desarrollo en la cual muerden las bolsas de hongo producido y lo contaminan.

1.7 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el constante mantenimiento a los techos del laboratorio particularmente en las salas de desarrollo para que no entren plagas.
2. Se recomienda tener siempre un monitoreo nocturno de los aires acondicionados ya que se descontrola y provoca la contaminación de hongo producido y perjudica la producción.
3. Se recomienda analizar una posible expansión de las instalaciones actuales para la producción de microorganismos en el aumento anual y de la demanda de los mismos.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
2. Del Cid, J. (2011). *Localización de fincas Ingenio Magdalena (correo electrónico)*. Escuintla, Guatemala: Ingenio Magdalena, SIG.
3. Elósegui Claro, O. (2006). *Métodos artesanales de producción de bioplágicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
4. García Estrada, S. R. (2013). *Distribución de las especies de malezas existentes en las zonas agroecológicas de la administración central del Ingenio Magdalena, diagnóstico y servicios, Escuintla, Guatemala, C.A. (Tesis Ing. Agr.)*. Obtenido de USAC, Facultad de Agronomía: Guatemala: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2895.pdf
5. Marquez, J. M., Callejas, A., & López, E. (2006). Entomología. En M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, & R. Espinoza, *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala* (págs. 119-124). Guatemala: Artemis Edinter.
6. Sauka, D. H., & Benintende, G. (2008). *Bacillus truringiensis: Generalidades; un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas*. Obtenido de Revista Argentina de Microbiología, 40(2): <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016787013>

The seal of the Academia Coactemalensis Inter Ceteris Conspicua Carolina is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a castle, and a lion. The shield is set against a background of green hills and a blue sky. The seal is surrounded by a circular border containing the Latin text "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERIS CONSPICUA CAROLINA".

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) Y SU CALIDAD DE ANTAGONISMO EN DIFERENTES CEPAS DE *Trichoderma* sp. PARA SU PRODUCCIÓN MASIVA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

2.1 PRESENTACIÓN

El uso de productos biológicos definidos como preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas en los sistemas productivos, es una alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo y follaje a un bajo costo, ya que no contamina el ambiente y mantiene la conservación de suelo, desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad.

El uso excesivo de químicos genera el riesgo de que residuos tóxicos se acumulen en el ambiente o en el cultivo comprometiendo la salud de las personas. Además, si los químicos no se utilizan adecuadamente los patógenos pueden generar resistencia, se puede romper el equilibrio biológico y destruir los insectos benéficos. Debido a esta problemática surge la necesidad de evaluar alternativas ecológicas como la utilización de agentes de control biológico.

Existen hongos antagonistas como por ejemplo *Fusarium sacchari*, *Phytophthora capsici*, que son utilizados para control biológico de otros hongos perjudiciales que causan enfermedades. Las especies de *Trichoderma* son los organismos que se aíslan con mayor frecuencia de los suelos agrícolas. Además, se han estudiado diversas formas de aplicar *Trichoderma* al suelo y a la superficie de las hojas para aumentar sus poblaciones e incrementar su control, debido a la naturaleza saprofita y a la versatilidad nutricional de este antagonista, que lo capacita para crecer sobre los mismos sustratos utilizados por los patógenos.

La habilidad para desarrollarse sobre amplios rangos de condiciones extremas de pH, es un importante componente del complejo conjunto de características que *Trichoderma*, mejor adaptado a suelos ácidos, encuentra durante esta interacción con otros organismos. Se ha observado que cepas de *Trichoderma* son capaces de inducir resistencia en las plantas, ya que aplicadas en la rizósfera, producen protección contra patógenos del suelo o foliares.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Marco Conceptual

2.2.1.1 Caña de azúcar

Su centro de origen es Nueva Guinea y fue llevada hacia islas cercanas de China e India. La caña de azúcar es una gramínea del género *Saccharum*, es una especie que se caracteriza por el desarrollo de su sistema vegetativo subterráneo del cual nace gran número de tallos y al conjunto de estos se les llama “cepa”, que inicialmente se originan de las yemas de los nuevos brotes subterráneos. La caña puede producir alrededor de 45 T/ha de masa seca al año, al considerar la parte aérea puede producir 22 T/ha azúcar al año (Sistema Potosino de Vigilancia Epidemiológica, México (SIPOVE), 2013).

2.2.1.2 *Trichoderma* sp.

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre que se encuentran comúnmente en el suelo y en el ecosistema de las raíces, algunas cepas son oportunistas, poseen una simbiosis virulenta con la planta y pueden establecer una colonización duradera en la superficie de las raíces o penetrar en la epidermis de las células por debajo de la misma. También puede antagonizar y controlar un rango amplio de patógenos de plantas económicamente importantes incluyendo hongos, virus y bacteria (Harman, 2006).

Este hongo actúa directamente sobre el patógeno por medio de micoparasitismo, producción de enzimas hidrolíticas, antibiosis y competencia por nutrientes, así como, la estimulación de mecanismos de defensa de las plantas y la producción de sustancias promotoras del crecimiento (Harman, 2006).

2.2.1.2.1 Historia

El género *Trichoderma* fue propuesto por primera vez por Pearson en 1794 con 4 especies. Este género consiste de hongos anamórficos que están aislados principalmente en el suelo y en la materia orgánica en descomposición (Chávez García, 2006). Fue clasificado inicialmente dentro de la clase Gasteromycete que posteriormente se realizó análisis exhaustivo de la estructura y características por lo que se modificó la clasificación hacia el género de los hongos filamentosos (Villegas, 2000).

Posteriormente Rifai en 1969 agrega 9 especies más: *Trichoderma piluliferum* Webster & Rifai, *Trichoderma polysporium* Rifai, *Trichoderma hamatum* Bain, *Trichoderma koningii* Rifai, *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Trichoderma pseudokonigii* Rifai, *Trichoderma viride* Pers ex S. F. Gray. Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas, como tipo de ramificación del conidióforo, forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia, entre otras (Michel Aceves, 2001).

Cada vez incrementa el uso en la agricultura actual, se toma en cuenta que la habilidad como organismo antagonista solo fue descubierta hace 50 años, en los últimos años, 34 artículos técnicos se han escrito con descripción de las bondades en el manejo biológico de los cultivos agrícolas (Sandoval Aguirre, 2013).

El hongo *Trichoderma* sp. puede desempeñarse como saprófito o como parásito de otros hongos. Es ampliamente conocido por su conducta antagonista y utilizada para el biocontrol, debido a su abundancia natural, a su facilidad para ser aislado y cultivado, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no ataca plantas. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno están fundamentalmente asociados a competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos y parasitismo directo de determinadas especies del hongo sobre otros hongos (Elías, Arcos, & Arbelaez, 1993). En el cuadro 3 se presenta el resumen sobre la historia taxonómica del género *Trichoderma* sp. según Rifai (1969) y Bisset (1991).

Cuadro 3. Resumen de la historia taxonómica del género *Trichoderma* sp.

AUTOR	FECHA	COMENTARIOS
Persoon	1794	Introduce el género <i>Trichoderma</i> spp., y describe a <i>T. harzianum</i> (Rifai), como sinónimo de <i>Pyrenium lignorum</i> var. <i>Vulgare</i> Tode (1790).
Fries	1829	Reduce la sinonimia de ambas especies a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Harz	1871	Realiza la primera delimitación del género con base en observaciones microscópicas de las fiálides.
Tulasne	1860	Identifica a <i>Trichoderma</i> spp., como Fungi Imperfecti.
Saccardo	1885	Crea el género <i>Pachybasium</i> spp., para incluir a 13 especies de <i>Trichoderma</i> spp., excluyendo a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Vuillemin	1887	Transfiere <i>T. viride</i> a <i>Acrostalagmusviride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Brefeld	1891	Menciona que <i>Hypocrea rufa</i> es sinónimo de <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oudemans y Koning	1902	Primera descripción de <i>Trichoderma</i> spp., en el suelo. Oudemans identifica a <i>T. koningii</i> (Qudem).
Cook v Taubenhau	1911	Reconocen diferencias entre <i>T. koningii</i> (Qudem.) y <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oale	1912-1914	Describe a <i>T. koningii</i> (Qudem.), <i>T. lignorum</i> (Harz), y <i>T. álbum</i> (Alb.).
Goddard	1913	Describe a <i>T. nigrovirens</i> (Goddard).
Waksman	1916	Reporta 5 cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en el suelo.
Abbott	1926	Describe 4 especies, incluyendo a <i>Trichoderma lignorum</i> (Lig.), <i>T. koningii</i> (Qudem) y <i>T. glaucum</i> (Abbott).
Gillman y Abbott	1927	Construyen una clave para identificar las especies de <i>Trichoderma</i> spp.
Beach	1937	Realiza el primer reporte de <i>Trichoderma</i> spp., y los síntomas que provoca como enfermedad del champiñón.
Bisby	1939	Al estudiar numerosas colecciones y cepas identificadas como <i>Trichoderma</i> spp., concluye que el género es monotípico (cuando un género se establece con una sola especie) y menciona que <i>Hypocrea gelatinosa</i> es en realidad <i>Trichoderma viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Rifai y Webster	1966	Demostraron que la nomenclatura de Bisby era errónea al examinar las diferencias entre <i>H. rufa</i> (Pers.), <i>H. aeuroviride</i> (Rifai), <i>H. vinosa</i> (Cooke), y otras especies de <i>Hypocrea</i> spp., no mencionadas.
Rifai	1969	Hace una revisión del género <i>Trichoderma</i> spp., ofrece una clave de identificación de 9 especies describiéndolas ampliamente. Actualmente es la clave más aceptada.
Bissett	1984-1992	Realiza una amplia descripción de <i>T. atroviride</i> (Bissett), sugiriendo que la descripción original realizada por Karsten (1892) debe ser modificada y ampliada de acuerdo a las nuevas técnicas disponibles (la microscopía electrónica y la genética molecular).
Doyle, Seaby, Chen, Castle y Hermosa.	1991-2000	Diferenciaron cuatro formas biológicas de <i>T. harzianum</i> (Rifai), <i>Th1</i> , <i>Th2</i> , <i>Th3</i> y <i>Th4</i> .
Sobal, M.	2004	Identifica a <i>T. aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> (Samuels & W. Gams), en la planta de Hongos México.

2.2.1.2.2 Clasificación taxonómica

Actualmente se tienen alrededor de 75 especies y cepas descritas. Determinar el número exacto de especies dependerá de la definición de especie, si se considera que la mayoría de las especies del género *Hypocrea*, representan especies de *Trichoderma*, por lo tanto habrá más de 100 especies según (Samuels, 1996).

La clasificación taxonómica actual según (Villegas, 2000):

Reino: Fungi

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Trichoderma* sp.

Con 27 especies conocidas como: *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link, *T. reesei* EG Simmons, *T. virens*, *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. lignorum* y *T. citroviride* (Villegas, 2000).

2.2.1.2.3 Descripción del hongo

Trichoderma presenta micelio septado, conidióforos en segmentos cortos de manera bifurcada en la hifa, conidios redondeados (Villegas, 2000).

El tamaño de los conidióforos varía entre 62.5 a 69 μm por 3 a 4.7 μm . Los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos

se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en ángulo amplio (Villegas, 2000).

El sistema de ramificación tiene apariencia piramidal. Las células conidiogénicas son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con tamaño de 6.3 a 15.6 μm por 2.7 a 3.4 μm , con verticilos terminales de hasta 4 conidios de tamaño aproximado de 3.8 a 4 μm por 3.1 a 3.7 μm , con forma citriforme y subglobosos (Villegas, 2000).

Produce clamidosporas en sustratos naturales, estas pueden ser globosas a subglobosas, terminales o intercalares de color verde formadas por el micelio sumergido, de pared dentada y menores a 15 μm de diámetro, es considerado también organismo saprofito del suelo y madera, el crecimiento en el suelo es más rápido que en madera (Samuels, 1996).

Los conidios son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. Se caracterizan por poseer pared exterior gruesa, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que protegen el interior denominado protoplasto (Villegas, 2000).

Esta pared se diferencia de paredes de células vegetativas del hongo (hifas y clamidosporas), en que son mucho más delgadas y no está formada por capas constitutivas como los conidios (Villegas, 2000).

La ventaja del mismo con dicha pared celular es la posibilidad de aislarlo en medio natural y presentar sobrevivencia a condiciones adversas, manteniéndose en dormancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación (Villegas, 2000).

La adaptación a diferentes condiciones ambientales facilita la amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías. Estos hongos son ampliamente conocidos por la producción de toxinas y antibióticos (Villegas, 2000).

2.2.1.2.4 Morfología

2.2.1.2.4.1 Características macroscópicas

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración blanca, verdes, amarillo o verdosas; las pareas con conidios se presentan con anillos concéntricos figura 7 (Chávez García, 2006).



Figura 7. Fotografía de características macroscópicas de *Trichoderma* sp.

El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo y muchas especies producen grandes cantidades de clamidiosporas, en cultivos sumergidos (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.4.2 Características microscópicas

Los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilada, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos. Hinchados en la región central, pero delgadas hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Los conidios son unicelulares subglobosas y oblongas, lisas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Chávez García, 2006) figura 8 (Romero, Olivera Costa, & Rodríguez, 2016).

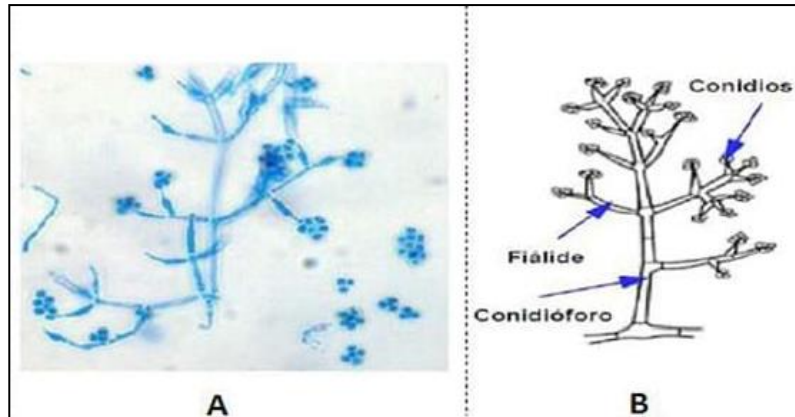


Figura 8. Características microscópicas de *Trichoderma* sp.
A) Hifas y conidióforos de *Trichoderma* sp. (1cm = 20 μ m).
B) Esquema de conidióforo de *Trichoderma* sp.

2.2.1.2.5 Ecología del microorganismo

El micelio y las esporas de resistencia de varios hongos fitopatógenos del suelo son invadidos y parasitados o bien lisados por otros hongos, que por regla general no son fitopatógenos. Entre los hongos micoparásitos más comunes se destaca *Trichoderma* sp. principalmente *Trichoderma harzianun*, que ha demostrado parasitismo sobre el micelio de *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotinia* sp. *inhibe el crecimiento de muchos otros hongos, como Pythium* sp. *Fusarium* sp. y *Fomes* sp. y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de esos patógenos (Agrios G. , 2004).

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zona de vida y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos le confiere a este hongo la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica (Chávez García, 2006).

Aparte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* sp., ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Varios autores reportan algunos mecanismos, con los cuales *Trichoderma* sp. actúan como biocontrolador y como colonizador de las raíces, como son: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta al ayudar al desarrollo del sistema radicular, mejorar la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y generando la resistencia inducida. Es importante resaltar que de estos, los primeros cuatro mecanismos mencionados tienen acción directa sobre el hongo fitopatógeno, los otros son indirectos, ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológica y bioquímica de la planta (Chávez García, 2006).

Es por esto que *Trichoderma* sp. presenta diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, además de esto produce gran cantidad de enzimas inducibles en presencia de hongos fitopatógenos. De las enzimas extracelulares producidas por *Trichoderma* sp. tres diferentes enzimas con actividad quitinolítica se han purificado y parcialmente caracterizado: N-acetil glucosamidasa, quitobiosidasa y endoquitinasa (Chávez García, 2006).

Así mismo varios autores han descrito la producción de β -1,3-glucanasa, quitinasa y proteinasas, cuya actividad se ve incrementada notoriamente cuando el hongo se cultiva en un medio de residuos orgánicos con quitina (Chávez García, 2006).

De este modo, este hongo puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita la producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitats donde los hongos causan enfermedad le permiten ser un eficiente agente de control (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.6 Biología

Trichoderma sp. se encuentra presente especialmente en el suelo, mayormente en los suelos que contienen abundante materia orgánica ya que en estos la disponibilidad de microflora y alimento es mayor. Por la relación con la materia orgánica se encuentra clasificado en el grupo de hongos hipógeos, ya que este hongo desarrolla y madura los cuerpos fructíferos en el suelo debido a que se desarrolla sobre sustratos compuestos principalmente por fibra vegetal, además de poseer metabolismo aeróbico y amplio espectro de características de resistencia tales como poder estar en los suelos con pH neutro hasta ácido (Sandoval Aguirre, 2013).

En el estadio temprano de *Trichoderma* sp. el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias del mismo, crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo de agar, dextrosa y papa (PDA) a 25 °C. Las especies de este género generalmente prefieren pH ácido de 4.5 a 5, además se desarrolla en áreas con excesiva humedad y estancamiento del bióxido de carbono en la atmósfera. Varios factores genéticos asexuales como la recombinación sexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación entre núcleos en el organismo (talo). Así, los hongos son altamente adaptables y evolucionan rápidamente. Existe gran diversidad en genotipos y fenotipos que constituyen cepas silvestres (Samuels, 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* sp. no tienen solamente el periodo asexual simple, sin embargo solo en pocas líneas ha sido posible identificar el periodo sexual (figura 9) (Samuels, 1996).

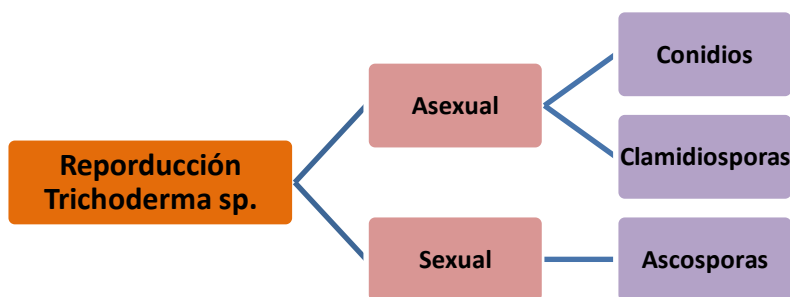


Figura 9. Dendograma de formas de reproducción de *Trichoderma* sp.

2.2.1.2.7 Ciclo de vida

El ciclo inicia cuando el organismo crece y se ramifica como hifa fúngica típica que mide de 5 a 10 μ de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3 a 5 μ de diámetro son liberadas en gran número. También se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar como se muestra en la figura 10 (Michel Aceves, 2001).

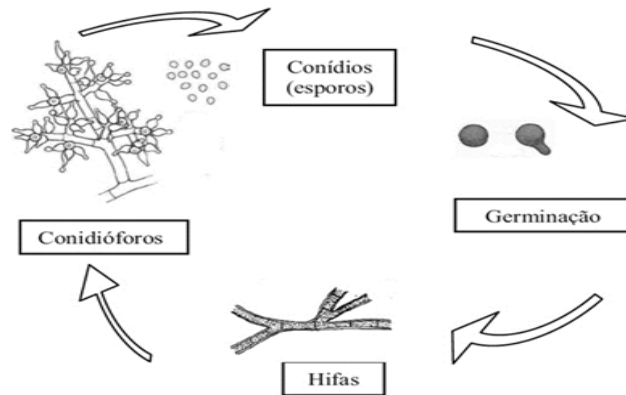


Figura 10. Diagrama del ciclo de vida de *Trichoderma* sp.

2.2.1.2.8 Factores que influyen en el crecimiento

2.2.1.2.8.1 Temperatura

La temperatura es un factor que se utiliza para determinar la cantidad y la tasa de crecimiento de estos organismos. Varios estudios han evaluado el efecto de la temperatura en la germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinal, crecimiento del micelio, habilidades competitivas y la producción de metabolitos y no volátiles en las especies de *Trichoderma* sp, estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre las diferentes especies, sin embargo al igual que la gran mayoría de los hongos, estos se desarrollan en rangos de temperatura mesofílicos entre 10 y 14 °C, pero en la mayoría de los casos, la temperatura óptima se encuentra entre 15 y 30 °C (Chávez García, 2006).

Por lo tanto el efecto de la temperatura sobre las especies de *Trichoderma* sp. en el desarrollo de procesos biológicos puede generar desnaturalización de proteínas, inhibición de enzimas, supresión de la producción de metabolitos particular, viabilidad y muerte celular (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.8.2 Disponibilidad de agua

Una de las limitaciones más importantes del uso de *Trichoderma* sp. como biofungicida es su bajo nivel de tolerancia (0.5 M o menos). Las condiciones de agua afectan las actividades de este hongo, en especial la germinación de la espora y el crecimiento del tubo germinal, así como el crecimiento de micelio, y tiene un efecto crítico en la interacción con otros hongos y la producción de enzimas (Chávez García, 2006).

Trichoderma sp. crece mejor en humedades moderadas que en humedades altas, por lo tanto es importante la aireación del suelo y el suministro de oxígeno, ya que al tener un contenido de humedad elevado, el suministro de oxígeno es muy limitado. En la fermentación sólida, cuando el nivel de humedad es mayor que el óptimo, éste causa varias desventajas: una disminución en la porosidad, alteración en la estructura de las partículas, menor transferencia de oxígeno e incrementa la formación de micelio aéreo (Samuels, 1996).

Los hongos prefieren una humedad suficiente para la supervivencia de tal manera que no interfiera con su mecanismo. De la misma manera cuando el nivel de humedad es menor que el óptimo, esto lleva a una mayor tensión de agua y reduce la solubilidad de los nutrientes del sustrato sólido. El contenido de humedad es un factor crítico durante este proceso, el contenido de agua en el sustrato por lo general está entre 30 y 75 % (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.8.3 pH

El pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* sp. tienen una habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6 con un pH óptimo de 4; y se ha reportado que la producción óptima de biomasa ocurre en un rango entre 4.6 y 6.8 (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.8.4 Aireación

Los dos componentes del aire que son esenciales para los hongos son el oxígeno y el dióxido de carbono. Las especies de *Trichoderma* sp. son anaerobios facultativos, tienen la habilidad para crecer en hábitat con suelos profundos, donde el oxígeno es relativamente insuficiente. Sin embargo en los cultivos de estos organismos es necesario tener en cuenta que las altas concentraciones de dióxido de carbono se debe al resultado de la respiración celular en la cual se pueden acumular en ambientes cerrados y de esta forma inhibir el crecimiento de este microorganismo, los hongos usualmente son inhibidos en concentraciones de dióxido de carbono mayores a 10 a 15 % (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.8.5 Condiciones de luz

El crecimiento de la mayoría de los hongos entomopatógenos aparentemente no es afectado por la luz. El efecto más visible es la inhibición, al estar en una exposición de luz fuerte. La luz también puede afectar la formación de estructuras reproductivas o puede controlar la orientación de los movimientos fototrópicos de estas estructuras. En algunos casos la luz puede afectar la esporulación de algunos hongos pudiendo ser inductora o inhibidora en la formación de estructuras reproductivas y esporas. Los efectos de la luz en la reproducción de los hongos son muy complejos, ya que especies cercanas o distintos aislamientos que son de la misma especie pueden diferir en su respuesta a la luz (Chávez García, 2006).

La mayoría de especies del género *Trichoderma* sp. son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales o artificiales, en patrones anulares concéntricos, en respuesta a la alternancia diaria de la luz y oscuridad, con producción de conidios durante el período luminoso. La máxima actividad fotoinductiva se encuentra entre los 380 y 440 nm rango visible, no ocurriendo esporulación bajo los 245 nm (Chávez García, 2006).

2.2.1.2.9 Descripción de los mecanismos de acción

Según Harman (2006), define que actualmente se reconocen los efectos de *T. harzianum* en el crecimiento radicular, con la colonización de la epidermis y liberación de biomoléculas, razón por la cual ha sido utilizado ampliamente en la agricultura moderna en incremento de producción y como biocontrolador de patógenos; esta última característica conocida al menos desde el año 1920; sin embargo, algunas cepas son más eficientes para el control de patógenos que otras y pueden ser en gran medida ineficaces contra hongos (Michel Aceves, 2001).

Los principales mecanismos de control sobre patógenos de suelo reconocidos son: micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes y espacio (Sandoval Aguirre, 2013).

2.2.1.2.9.1 Micoparasitismo

Según Harman (2006), los estudios de micoparasitismo demuestran que *Trichoderma* produce diversas enzimas antifúngicas (quitinasa y β -1,3 glucanasa), que degradan la pared celular de patógenos. Este proceso inicia con el crecimiento hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o con estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían penetrar al interior del patógeno, algunas cepas tienen este comportamiento frente a hongos del suelo causantes del “*damping-off*” o mal de los almácigos.

Las especies *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *T. hamatum*, se reportan como micoparásitos de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *P. aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora nicotianae*, *Rosellinia necatrix*, *Fusarium oxysporum* y *F. roseum* (Stefanova Nalimova, 1995).

2.2.1.2.9.2 Competencia

Michel Aceves (2001), lo define como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante el mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por parte de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás.

El factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de más elementos, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Alvarez & Sivila, 2013).

2.2.1.2.9.3 Antibiosis

Se refiere a la producción por parte del microorganismo de sustancias tóxicas para los microorganismos patógenos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.), estos metabolitos volátiles y no volátiles, son 43 del tipo antibiótico como: viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide. De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría con la inhibición de la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto la propia reproducción (Stefanova Nalimova, 1995).

2.2.1.2.9.4 Utilización en programas de control biológico

Según Stefanova Nalimova (Control de enfermedades fúngicas del suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*, 1997), se han utilizado programas de control biológico en aplicaciones comerciales, lo han utilizado en plantaciones que utilizan el

programa de uso limitado de productos químicos, por características como la producción de enzimas altamente nutritivas y por la regulación de fitopatógenos, por lo que se ha utilizado con éxito en tratamiento de semilla y al sustrato contra hongos involucrados en el complejo “damping off” en tomate, tabaco y chile pimiento, además de ser compatible con biofertilizantes, bioestimulantes y algunos plaguicidas.

En el estado de Mérida, México, productores de hortalizas, reemplazaron el control químico a base de Pencycurón, por el manejo integrado de enfermedades fungosas de suelo: Rizoctoniasis de la papa (*Rhizoctonia solani*), Pudrición blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum*) y Hernia de las crucíferas (*Plasmodiphora brassicae*); con incorporación de *T. harzianum*, con lo cual se reporta una disminución significativa en incidencia de: *P. brassicae* del 40 %, *R. solani* del 20 al 26 % y *S. cepivorum* del 27 %, añadido a incremento en producción en los tres casos (García, y otros, 2005).

El aislamiento de 105 diferentes cepas nativas de *Trichoderma sp.* en suelos de plantaciones de mango afectadas por la enfermedad “escoba de bruja” (*Fusarium sp.*) en el estado de Guerrero, México; fueron elegidas y evaluadas antagónicamente 25 cepas, de las cuales todas presentan antagonismo por antibiosis, micoparasitismo y competencia directa contra *Fusarium sp.*; por lo que considera un recurso valioso para la evaluación como agente potencial de control biológico de fitopatógenos aéreos y presentes en el suelo en programas fitosanitarios (Michel Aceves, 2001).

2.2.1.2.10 Producción de *Trichoderma sp.*

Las necesidades nutricionales generales de *Trichoderma sp.* son muy conocidas, ya que es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa, entre otros; y emplearlos para el crecimiento, ya que posee complejo enzimático (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). También asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio (Gamez, Zapata, Oveido, & Barrera, 2008).

La producción de los metabolitos y biomasa por parte de *T. harzianum* depende de la composición del medio donde se desarrolla, es decir de los nutrientes presentes en el medio sin importar en dicho caso la concentración del inóculo (Tronsmo, 1992).

Según Fernández-Larrea (2004) *Trichoderma* sp. como biocontrolador posee características deseables, por el alto poder patogénico; sin embargo, la producción a escala comercial e industrial presenta algunos inconvenientes como diversidad de cepas, con requerimientos específicos para la obtención del potencial productivo en los diferentes sustratos, además de infraestructura y equipo mínimo necesario; situación que ha limitado el desarrollo y utilización a mayor escala.

2.2.1.3 *Fusarium* sp.

2.2.1.3.1 Clasificación taxonómica

El género *Fusarium* sp., fue descrito por Link en 1809. Desde entonces la taxonomía ha sido muy complicada debido a que las descripciones iniciales se hicieron en base a las características que varían, según los medios que se utilizaban. Se considera que este género exhibe un grado de variación con respecto a la morfología microscópica y a sus características fisiológicas, debido a su gran habilidad para colonizar diversos hábitats ecológicos (Nelson, Digna, & Anaissie, 1994).

La correcta identificación de las especies de *Fusarium* sp. requiere de una observación detallada del cultivo, ya que el género se caracteriza por una gran variabilidad morfológica bajo diferentes condiciones de cultivo. Las características que permiten la identificación del género *Fusarium* sp. se determinan macroscópicamente y microscópicamente. Estas son agrupadas en características primarias y secundarias, utilizadas para separar las especies. Las características primarias incluyen: la forma de los macroconidios, origen y forma de los microconidios, tipo de conidióforo, y la presencia o ausencia de

clamidosporas, mientras que en las secundarias se encuentran: la presencia o ausencia de esporodoquios, morfología y pigmentación de la colonia (Vera Roman, 2013).

2.2.1.3.2 Sintomatología de la enfermedad causado por *Fusarium* sp.

Los síntomas pueden aparecer en cualquier etapa de desarrollo, desde que se colocan en la maceta definitiva, hasta la etapa de pigmentación; durante este periodo se puede ver que el follaje de las plantas se marchita, las ramas se colapsan, las hojas caen y la planta muere

Las hojas o partes de las plantas infectadas pierden turgencia, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso. Las hojas marchitas pueden estar extendidas o bien enrollarse. Los retoños tiernos y jóvenes también se marchitan y mueren (Molina Santos, 2006).

Produce marchitez vascular, infectando a las plantas a través de sus raíces, en las que penetran directamente o a través de heridas, la pudrición de la raíz y del tallo en un principio se presenta en forma de áreas blandas que más tarde adquieren un color que va de café a negro, en algunos casos se cubre de micelio blanco. Las raíces, tallos y otros órganos son destruidos rápidamente, hasta que toda la planta muere o muestra un desarrollo insuficiente (Agrios G. N., 2008).

2.2.1.3.3 Morfología de *Fusarium* sp.

2.2.1.3.3.1 Macroconidios

Los macroconidios son la característica morfológica más importante en la identificación de especies de *Fusarium* ya que la morfología de esta spora es suficiente para identificar a las especies de un cultivo (Leslie & Summerell, 2006).

El primer carácter macroconidial es el tamaño, la longitud en términos de largo o corto, sin tener en cuenta la anchura o curvatura. Hay tres formas básicas: En primer lugar, no son macroconidios rectos, que pueden aparecer en forma de aguja si son delgada. La siguiente son macroconidios con curvatura dorsiventral a lo largo de toda o una porción de la espora. Estas esporas por lo general, pero no siempre, son aproximadamente de la misma anchura a lo largo de toda su longitud. Por último, hay macroconidios en el que el lado dorsal (superior) es claramente más curva que la parte ventral (inferior). En estas esporas, las células en el medio de la espora por lo general son más anchas que las células en los extremos. Los extremos de los macroconidios a menudo son importantes en determinaciones morfológicas. La forma tanto apical y del pie de la célula pueden ser también importantes delimitadores de especies (Leslie & Summerell, 2006).

Hay cuatro formas generales de las células apicales: desafilado, papillate, ganchudo y estrecha. Los caracteres de diagnóstico más importantes son el grado de curvatura, longitud relativa, y de forma general. La célula basal, o el pie, también tiene cuatro formas generales: en forma de pie, la forma de pie alargado, con marcas y sin marcas. La célula basal por lo general es la menos curvada de la espora. Las características más importantes son la longitud relativa de la célula y su forma (Leslie & Summerell, 2006).

2.2.1.3.3.2 Microconidios

Microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium* sp. por lo que su sola presencia es una característica importante. La primera característica de los microconidios es el tamaño. El número de septos para los microconidios son normalmente de 0 o 1, pero algunas especies pueden producir conidios con dos septos. Las formas más comunes de los microconidios son: ovalada, reniforme (forma de riñón), ovoide con una base truncada, piriforme (forma de pera), napiforme (forma de nabo-cormo), globosa y fusiforme (forma de huso). Un solo cultivo puede producir microconidios con más de una forma. En algunos casos, la frecuencia relativa de las esporas con diferentes formas puede variar (Leslie & Summerell, 2006).

Las células conidiógenas son de dos tipos básicos: monofialides y polifialides. La diferencia se debe al número de aberturas por célula a través del cual se producen los conidios. Los monofialides sólo tienen una sola abertura por célula, mientras polifialides tiene más de una. Los microconidios pueden disponer sobre los fiálides solos en cadenas, o en falsas cabezas. La longitud de las cadenas puede variar desde unas pocas esporas a un rodillo muy largo. La formación de la cadena puede depender del medio utilizado. La longitud de los microconidios en forma de cadena puede ser un importante carácter de la especie y la longitud de estos en el micelio aéreo debe tenerse en cuenta. Las especies de *Fusarium* sp. no producen verdaderos conidios como las que se encuentran en algunos otros hongo (Leslie & Summerell, 2006).

2.2.1.3.3 Clamidiosporas

Las clamidiosporas son una característica importante en muchas descripciones de las especies de *Fusarium* sp. no están bien conservadas evolutivamente, sin embargo, las especies que producen clamidiosporas pueden estar estrechamente relacionadas con aquellas que no lo hacen. Las clamidiosporas se pueden formar por separado, en grupos y en cadenas. Estas pueden tardar mucho tiempo (más de 6 semanas) para reproducirse, y puede no ser producido en grandes cantidades (Vera Roman, 2013).

2.2.1.4 Uso de agentes de control biológicos

Para el manejo de enfermedades existen varios métodos como el uso de productos de síntesis químicas, cultivos resistentes y el control biológico. El concepto de control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga y es una alternativa promisorio al uso extendido de plaguicidas, los cuales a menudo son caros, se acumulan en el suelo o plantas y tienen un efecto adverso en los humanos (Alvarez & Sivila, 2013).

Dentro de los agentes de control biológico se pueden encontrar hongos como *Trichoderma* sp. y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR siglas en inglés) de los géneros *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* entre otras (Vera Roman, 2013).

2.2.1.5 Paquete ScottKnott

El paquete ScottKnott fue escrito en lenguaje R (R Core Team, 2013). Los resultados son objetos de la lista de clases, SK y SK.nest, que se utilizan como entrada para el resumen y el gráfico de funciones genéricas. Realiza el algoritmo de agrupamiento en tres diseños y tres experimentos. Una vez más, se debe enfatizar nuevamente que las dos funciones SK y SK.nest solo funcionan en diseños equilibrados. Los diseños son: diseño completamente aleatorizado (CRD), diseño de bloqueo completo aleatorizado (RCBD) y diseño de cuadrados latinos (LSD). Los experimentos son: Experimento factorial (FE), Experimento de trazado dividido (SPE) y Experimento de trazado dividido dividido (SSPE) (R Core Team, 2013).

El paquete ScottKnott tiene dos funciones principales: SK y SK.nest. La función SK se utiliza para agrupar los medios de tratamiento de un factor principal. La función SK.nest, a su vez, se utiliza para agrupar los medios de tratamiento en relación con las interacciones entre factores, es decir, siempre que los medios de tratamiento pertenezcan a un factor anidado en otros. Por ejemplo, el medio de tratamiento del factor A, para el nivel 1 del factor B y el nivel 1 del factor C. Como se muestra arriba, la función SK.nest no admite más de dos anidamiento (R Core Team, 2013).

La función de resumen genera un resultado donde los diferentes grupos se muestran como letras del alfabeto. La función de trazado genera distintos grupos que se diferencian por colores (R Core Team, 2013).

El algoritmo principal es la función MaxValue que construye grupos de medios de acuerdo con el método de SK. Básicamente es un algoritmo para una ruta de pre orden en un árbol

de decisión binario. Cada nodo de este árbol representa un grupo diferente de medios y cuando el algoritmo alcanza este nodo, toma la decisión de dividir el grupo en dos o formar un grupo de medios. Al final, todas las hojas del árbol son los grupos de medios homogéneos (R Core Team, 2013).

2.2.2 Marco Referencial

2.2.2.1 Ubicación geográfica de la finca San Patricio

El experimento se realizó en el Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena S.A., la cual pertenece al Departamento de Servicios Técnicos Agrícolas, área de Manejo Integrado de Plagas (MIP); dicho laboratorio se encuentra ubicado en la finca San Patricio, ubicada en el Municipio de la Democracia, Escuintla a 106 km de la ciudad capital de Guatemala.

El casco de la Finca San Patricio de acuerdo a la clasificación ecológica de Holdridge, se encuentra dentro de la zona de vida subtropical cálida, la cual está caracterizada por una precipitación pluvial de 1,700 mm y una temperatura promedio de 27.01 °C y está ubicada en la Llanura costera del pacífico, abanico aluvial de los ríos Achíguate y Acomé (Del Cid, 2011).

2.2.2.2 Extensiones, límites y colindancias

Sus colindancias son al norte con las Fincas Santa Cristina y Quien Sabe, al Sur con las Fincas Las Ilusiones, Santa Mónica y Santa Elisa, al Oeste con las Fincas Santa Ricarda y Buganvilia y al Este con la Finca La Flor como se observa en la figura 11 y 12. Su extensión territorial es de 641.44 ha (Del Cid, 2011).

2.2.2.3 Condiciones del laboratorio

El manejo del experimento se realizó bajo condiciones controladas, teniendo una temperatura constante de 24 °C y humedad relativa del 80 % con luminosidad constante, condiciones en las cuales el metabolismo fúngico de los organismos no se ve mermado.

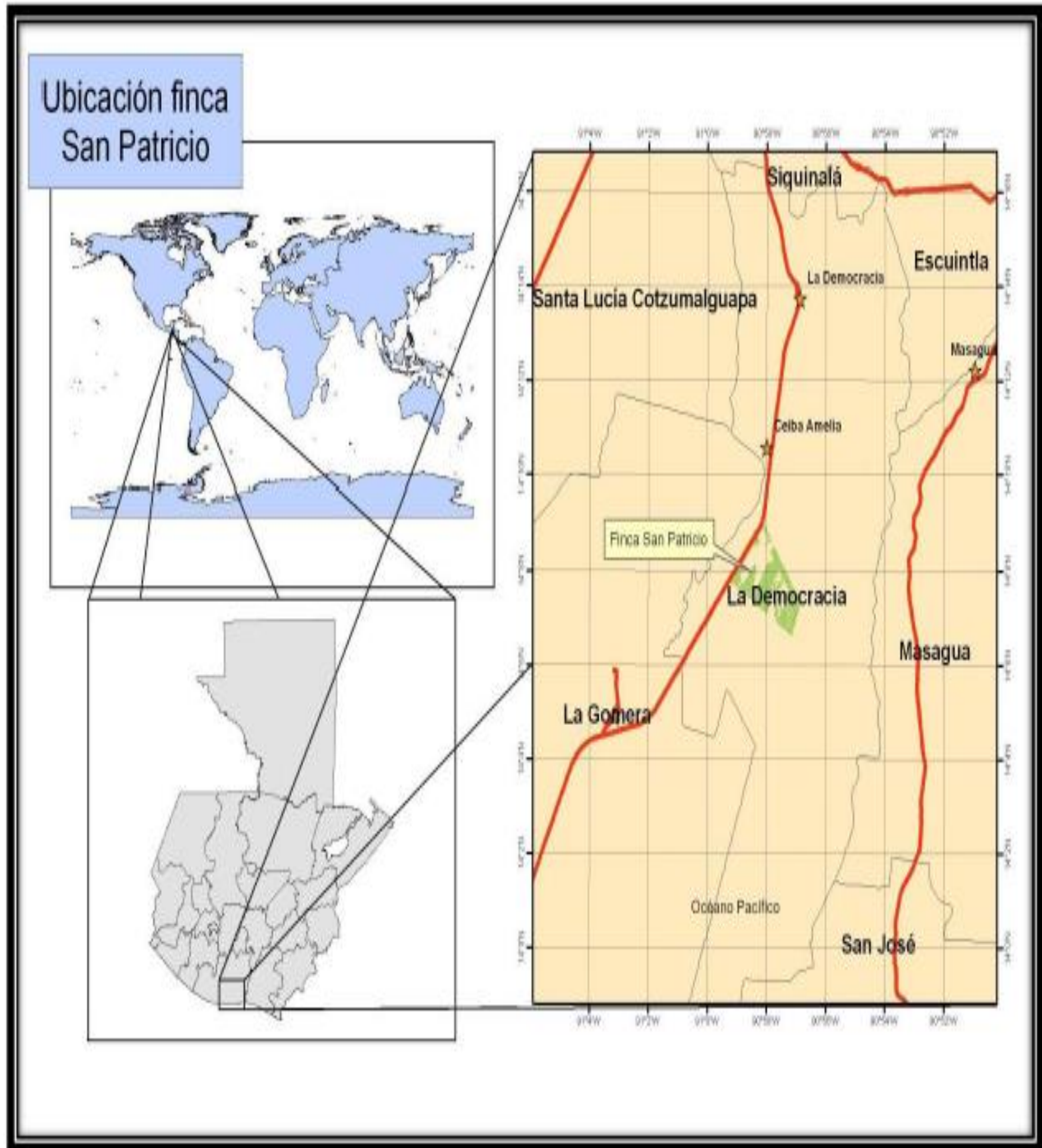


Figura 11. Mapa de ubicación geográfica de la finca San Patricio.

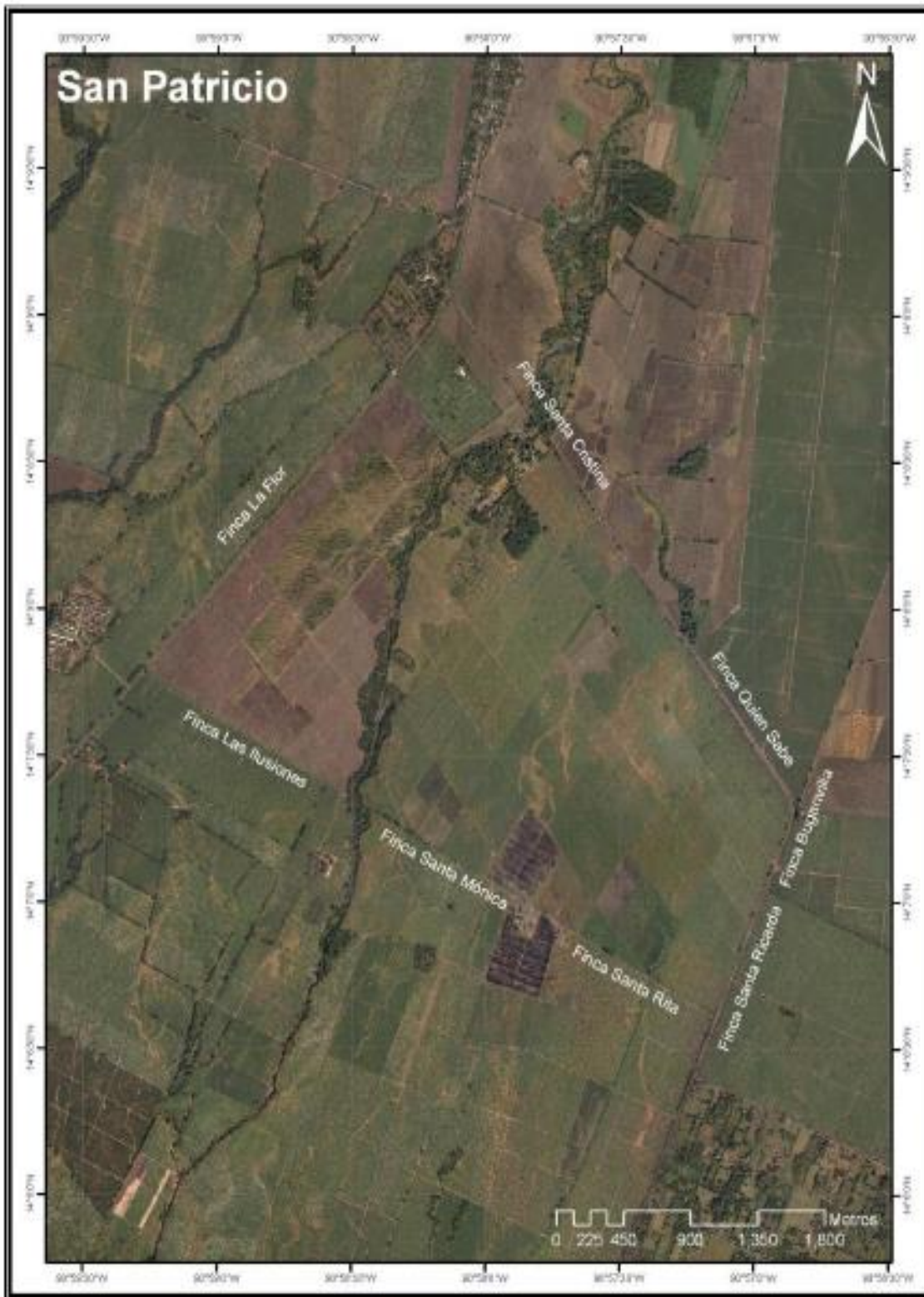


Figura 12. Mapa de colindancias de la finca San Patricio

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Evaluar el rendimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y su calidad de antagonismo en diferentes cepas de *Trichoderma* sp. para su producción masiva, Ingenio Magdalena S.A., La Democracia, Escuintla, Guatemala C.A.

2.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la concentración de conidios por gramo de las cepas de *Trichoderma* sp.
1. Determinar el porcentaje de germinación o viabilidad de las cepas de *Trichoderma* sp.
2. Identificarla cepa de *Trichoderma* sp. que posee mayor grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari*.

2.4 HIPÓTESIS

1. Una de las cepas de *Trichoderma* sp. representará ser la mejor para determinar la concentración de conidios para su producción masiva.
2. Una de las cepas de *Trichoderma* sp. presentará mayor porcentaje de germinación o viabilidad para su producción masiva.
3. Alguna de las cepas obtendrá mayor grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari* para su producción masiva.

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 Factor estudio

El factor estudiado fueron las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. para determinar la concentración de conidios, porcentaje de germinación o viabilidad y su grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari*.

2.5.2 Tratamientos

Los tratamientos utilizados fueron las cepas de *Trichoderma* sp. que se describen en el cuadro 4. Dichas cepas son colección del Laboratorio de Microorganismos Ingenio Magdalena S.A.

Cuadro 4. Cepas de *Trichoderma* sp. evaluadas, Ingenio Magdalena, 2017.

Tratamiento	Cepa	Tratamiento	Cepa
T1	Cg 14-01	T12	Cg 14-13
T2	Cg 14-02	T13	Cg 14-14
T3	Cg 14-03	T14	Cg 14-15
T4	Cg 14-04	T15	Cg 14-16
T5	Cg 14-05	T16	Cg 14-17
T6	Cg 14-06	T17	Cg 14-18
T7	Cg 14-07	T18	Cg 14-19
T8	Cg 14-08	T19	Cg 14-20
T9	Cg 14-09	T20	TRI 002
T10	Cg 14-10	T21	TRI 003
T11	Cg 14-12	Testigo	Agua estéril más glucosa al 2 %

Fuente: elaboración propia, 2017.

2.5.3 Variables de respuesta

2.5.3.1 Concentración de cepas

Se determinó la concentración de cada cepa por medio de conteos de conidios, utilizando la cámara de Neubauer o Hematocímetro. Para determinar la concentración de conidios por gramo de las diferentes cepas, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. conidios/g} = \frac{\left(\frac{\Sigma \text{ cuadrante}}{\# \text{ de cuadrante}}\right) * 10000 * \text{vol. agua} * \text{Dil.1} * \text{Dil.2} * \text{Dil n}}{\text{Peso inicial}}$$

Descripción:

Conc. = Concentración

Σ cuadrantes = sumatoria de cuadrantes (se suman los conteos realizados en los 8 cuadrantes que tiene la cámara de Neubauer).

de cuadrantes = número de cuadrantes.

Vol. agua = Volumen de agua (500 mL).

Dil. = Dilución.

2.5.3.2 Porcentaje de germinación o viabilidad

Se determinó la proporción de conidios viables de *Trichoderma* sp. por medio de siembra de esporas en medio PDA, la cual se dejaron expuestas a la luz por 8 h y se colocaron en la cámara refrigerada para detener la germinación. La lectura se realizó a las 15 h después de la siembra. Para determinar el porcentaje de germinación o viabilidad se empleó la siguiente ecuación:

$$\%G = \frac{C_g}{C_t} \times 100$$

Descripción.

%G = Porcentaje de Germinación

Cg = Conidios germinados

Ct = Conidios totales (mínimo 100)

2.5.3.3 Grado de antagonismo

El grado de antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium sacchari*, fue realizado de acuerdo al método del cultivo dual, que consiste en un enfrentamiento equitativo del hongo patógeno y el hongo antagonista. Para determinar el grado de antagonismo se utilizó la escala de capacidad antagónica del referido de Bell et al. (1982) descrita en el cuadro 5.

Cuadro 5. Escala de capacidad antagónica in vitro.

GRADO	CAPACIDAD ANTAGÓNICA
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo.
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ningún organismo parece dominar al otro.
4	El patógeno coloniza las dos terceras parte de la superficie del medio de cultivo y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio de cultivo.

Fuente: Bell, Wells, & Markham (1982).

2.5.4 Unidad experimental

La unidad experimental constó de: una bandeja plástica semiplanas, con las siguientes dimensiones: 35 cm de ancho por 45 cm de longitud; la cual contenía 700 g de arroz esporulado de *Trichoderma* sp. y estas se establecieron dentro de un salón con condiciones controladas de iluminación artificial, humedad del 80 % y temperatura constante 25 °C, esto para favorecer el desarrollo y crecimiento del patógeno (figura 13).



Figura 13. Fotografía de una unidad experimental (Bandeja con 700 g de arroz esporulado de *Trichoderma* sp.).

Se realizó el proceso de aleatorización de las unidades experimentales, en el espacio físico de 8 estantes verticales, divididos en 6 espacios horizontales (figura 14), obteniendo los resultados finales presentados en la figura anterior.



Figura 14. Fotografía de las unidades experimentales

2.5.5 Manejo del experimento

2.5.5.1 Producción de las cepas de *Trichoderma* sp.

La producción de las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. fue realizado de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena S.A. y de la siguiente manera:

1. En cajas petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) se sembraron las cepas de *Trichoderma* sp.
2. El contenido de cada caja petri de las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. fue disuelta en 150 mL de agua estéril más glucosa al 2 % (figura 15) y se obtuvo el inóculo (figura 16).



Figura 15. Fotografía de la disolución de la caja petri de *Trichoderma* sp.



Figura 16. Fotografía del inóculo de las cepas de *Trichoderma* sp.

3. Se esterilizaron bolsas de polipropileno que contenían 350 g de arroz entero precocido. Estas se esterilizaron a 120 °C a 20 psi por 45 min.
4. Al obtener la bolsas de arroz frías, se inyectó 12 mL de inóculo de *Trichoderma* sp. utilizando jeringas estériles (figura 17).



Figura 17. Fotografía de la inoculación de bolsas.

5. Las bolsas se identificaron conforme a cada cepa, luego estas se ordenaron en los estantes (figura 18).



Figura 18. Fotografías de la identificación de bolsas (lado izquierdo) y de bolsas ordenadas en estantes (lado derecho).

6. Después de 36 h de la inoculación, el contenido de las bolsas comenzaron a tornarse de color blanquecino, es decir que algunas están formando micelio (figura 19).

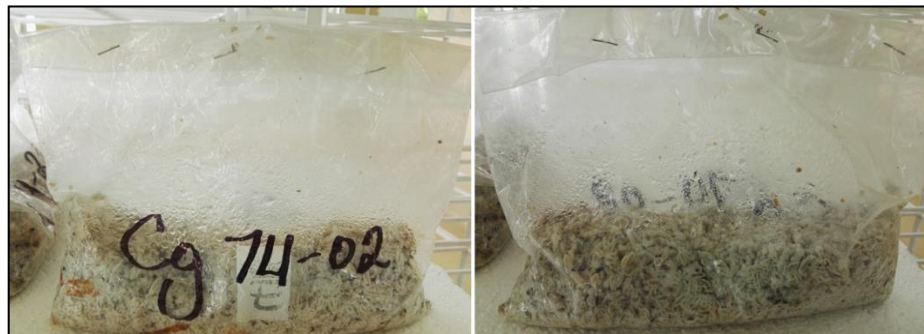


Figura 19. Fotografía de la formación de micelio.

7. Al pasar 48 h después de la inoculación se colocaron en bandejas, teniendo por cada cepa 4 bandejas, cada bandeja es una repetición.
8. Luego de 36 h de estar en bandejas se llevó a cabo el movimiento del arroz y se humedecieron las bandejas con agua estéril, esto se realiza para homogeneizar el sustrato y que el micelio se disperse en los espacios vacíos del arroz. Se realizó movimientos diarios por 5 días.
9. Se tomó la humedad del hongo y ésta tiene que estar en un rango de 12 a 15 %.
10. Cada bandeja se almacenó en bolsas de polipropileno.
11. Se trasladaron a una cámara refrigerada para detener la esporulación.

2.5.5.1.1 Concentración de cepas

Para obtener la concentración de cepas se realizó la solución madre y las respectivas diluciones. A continuación se describe el proceso para realizar la solución madre y las diluciones.

- **Solución madre**

Las soluciones madres de las diferentes cepas fueron preparadas en erlenmeyer de 1000 mL colocando 10 g del sustrato de *Trichoderma* sp. en 500 mL de agua desmineralizada estéril con tween 20 al 0.1 %. Luego se le colocó un agitador magnético, colocado en una estufa agitadora y por 5 minutos agitando la solución. De esta forma queda preparada la suspensión madre de la cual se extrajeron muestras para las diluciones.

- **Diluciones**

Las diluciones fueron preparadas en tubos de ensayo estériles colocando una alícuota de 1 mL de solución madre y 9 mL de agua destilada estéril con tween 20 al 0.1 % se obtiene la dilución 10^{-1} , luego en otro tubo de ensayo se colocó 1 mL de la dilución 10^{-1} con 9 mL de agua destilada estéril para obtener la dilución 10^{-2} (figura 20). Se continuó de igual forma hasta obtener la dilución requerida para el recuento de conidios en la cámara de Neubauer.

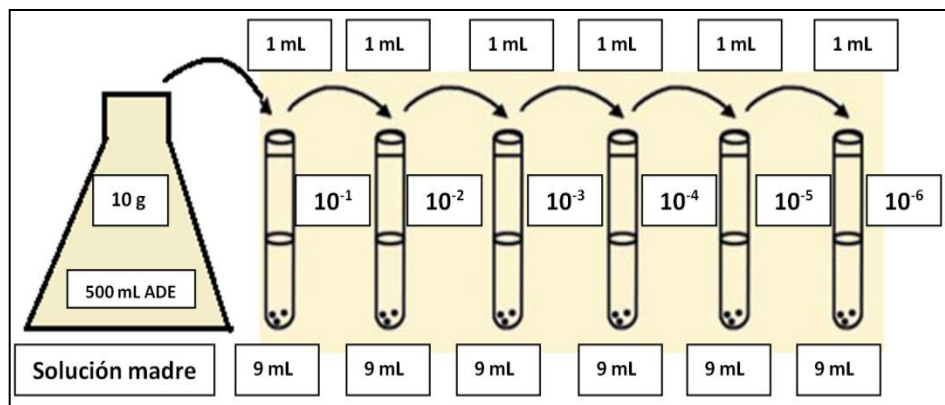


Figura 20. Proceso de diluciones.

- **Conteo de conidios en la cámara de Neubauer**

Al tener preparado las diluciones deseadas, se extrajo de estas con una pipeta pasteur y se llenó la cámara, se colocó el cubreobjeto. Con un microscopio utilizando el aumento 40X se observaron las estructuras conidiogénicas. Se contaron las esporas presentes en los cuadrados elegidos, es decir, se contaron los cuadrantes de los cuatro ángulos, se realizó en forma diagonal, empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se contaron las conidias que estaban ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se circulan el cuadrante. Se contaron en total 8 cuadrantes, cuatro en cada campo (4 en el campo 1 y 4 en el campo 2) (figura 21).

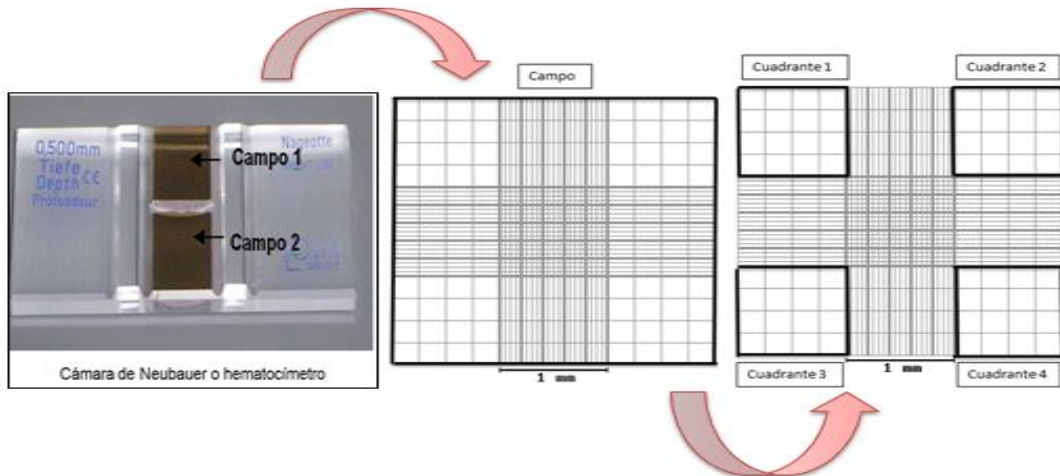


Figura 21. Cámara de Neubauer o Hematocímetro

2.5.5.1.2 Porcentaje de germinación o viabilidad

- Se tomó con una espátula de laboratorio una pequeña muestra de hongo y se depositó en tubo de ensayo conteniendo agua destilada más tween.
- Se agitó manualmente para suspender las esporas, luego con una pipeta Pasteur se tomó una alícuota y se depositaron cuatro gotas, sobre medio de cultivo PDA (medio sólido) contenido en una caja petri.
- La suspensión de esporas no debe ser muy concentrada, se utilizó una dilución de 10^{-7} .
- Las cajas petri sembradas se incubaron a 25 °C durante 7 h.
- Transcurrido el tiempo de incubación se colocó en una cámara refrigerada para detener la germinación, al día siguiente llevó al microscopio (lente 40X) y se realizaron las lecturas (figura 22). Se cuentan los conidios germinados. Se efectuaron 4 conteos por cada caja petri. Con los datos que se obtuvieron se calculó el porcentaje de germinación o viabilidad utilizando la ecuación descrita en el inciso 2.5.3.2.

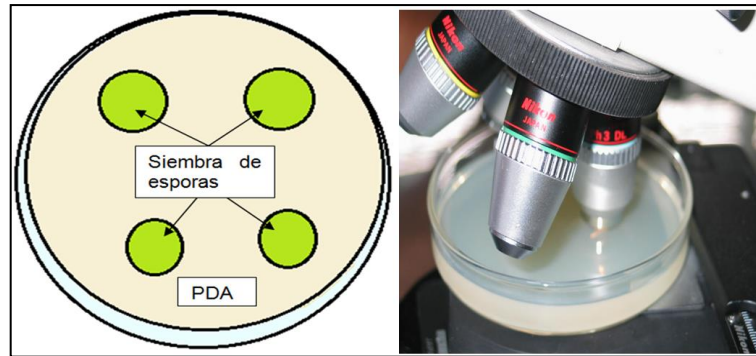


Figura 22. Siembra de esporas (lado izquierdo) y fotografía de la lectura del porcentaje de germinación o viabilidad en el microscopio (lado derecho).

2.5.5.1.3 Grado de antagonismo

El antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma sp.* Contra *Fusarium sacchari* fue realizado de acuerdo al método del cultivo dual que consiste en un enfrentamiento equitativo del hongo patógeno (*Fusarium sacchari*) y el hongo antagonista (*Trichoderma sp.*), en una caja Petri de 90 mm por 15 mm con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), en un extremo a 1.5 cm desde la orilla se colocó un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo patógeno y en el otro extremo un disco de 5 mm del micelio del antagonista, la distancia entre hongos fue de 6 cm, incubado a 25 °C con 9 h de luz (Elías, Arcos, & Arbelaez, 1993).

Para determinar el grado de antagonismo se utilizó la escala de capacidad antagónica del referido de Bell et al. (1982) descrita en el cuadro 5.

2.5.6 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio, por esta razón el diseño experimental utilizado fue el diseño completamente al azar. El modelo estadístico-matemático asociado a este diseño se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, n$ tratamientos

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

Siendo:

- Y_{ij} = variable respuesta medida en la ij -ésima unidad experimental.
- μ = Media general de la variable respuesta
- τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento en la variable dependiente.
- ϵ_{ij} = error experimental asociado a la ij -ésima unidad experimental.

2.5.7 Análisis de la información

Para las variables concentración de cepas y porcentaje de germinación o viabilidad se realizó análisis de varianza, verificando el cumplimiento de los supuestos que validan el modelo estadístico-matemático. Los datos fueron procesados en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2013), posteriormente se realizó una prueba de medias utilizando el comparador ScottKnott.

Para analizar el grado de antagonismo se utilizó la escala de capacidad antagónica del referido de Bell et al. (1982), como se describe en el cuadro 5.

2.5.7.1 Concentración de cepas

Se determinó por medio de lecturas en cámara Neubauer o Hematocímetro, se diluyó la muestra de la siguiente manera: de la solución madre concentrada se tomó 1 mL de alícuota y se diluyó en 9 mL de agua desmineralizada estéril en tubo de ensayo, a partir de esta solución (1:09), hasta obtener la dilución que se requiere, se tomó 0.1 mL y se colocó en la cámara para la lectura de concentración de conidios en el microscopio, por medio de

conteo de conidios por cuadrante en la cual se utilizó la ecuación descrita en el inciso 2.5.3.1.

2.5.7.2 Porcentaje de germinación o viabilidad

Se determinó el porcentaje de germinación o viabilidad por medio de conteos de conidios germinados en medio PDA que fueron incubadas por 8 h. Esto se realizó para observar la variabilidad de germinación de conidios entre las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. la viabilidad mínima aceptable es del 80 % para formar nueva colonia.

2.5.7.3 Grado de antagonismo

Se utilizó cultivo puro de *Fusarium sacchari* y de cada cepa de *Trichoderma* sp, en ambos casos se extrajo un disco de 5 mm, los cuales se colocaron en los extremos opuestos de la caja petri con medio de cultivo PDA, teniendo una separación de 6 cm entre uno y otro (figura 23). Luego del periodo de incubación de 24 h a 25 °C; se evaluó el grado de antagonismo con la escala de capacidad antagónica del referido de Bell et al. (1982) descrita en el cuadro 5.

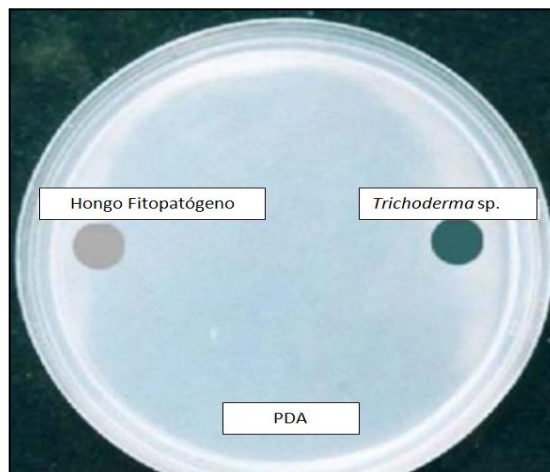


Figura 23. Colocación del patógeno y antagonista en caja petri.

2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.6.1 Concentración de cepas

Cada cepa obtuvo una diferente esporulación en la bandeja, unas fueron más rápidas que otras. Al colocar el sustrato en la bandeja se pudo observar cómo el hongo generaba agua, por medio de la transpiración, según el Coordinador del Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena S.A. dice que la transpiración del hongo es señal que el hongo está vivo. No todas las cepas tenían la misma transpiración esto puede ser que el hongo es muy viejo o está muerto.

Con base a la observación de las bandejas se puede concluir cuál cepa sería la que tendría mejor concentración de conidios por gramo, básicamente por las características; rapidez de esporulación, transpiración del hongo, coloración del sustrato a un verde musgo; pero hasta realizar el conteo de conidios en la cámara de Neubauer o hematócmetro se pudo obtener los resultados concretos.

Para obtener la concentración de conidios por gramo se realizó el conteo a las 4 unidades experimentales (repeticiones) de cada cepa de *Trichoderma* sp. en la cámara de Neubauer o Hematócmetro y mediante la ecuación de concentración de conidios por gramo.

En la figura 24, se observa la gráfica de las concentraciones de las cepas de *Trichoderma* sp. evaluadas:

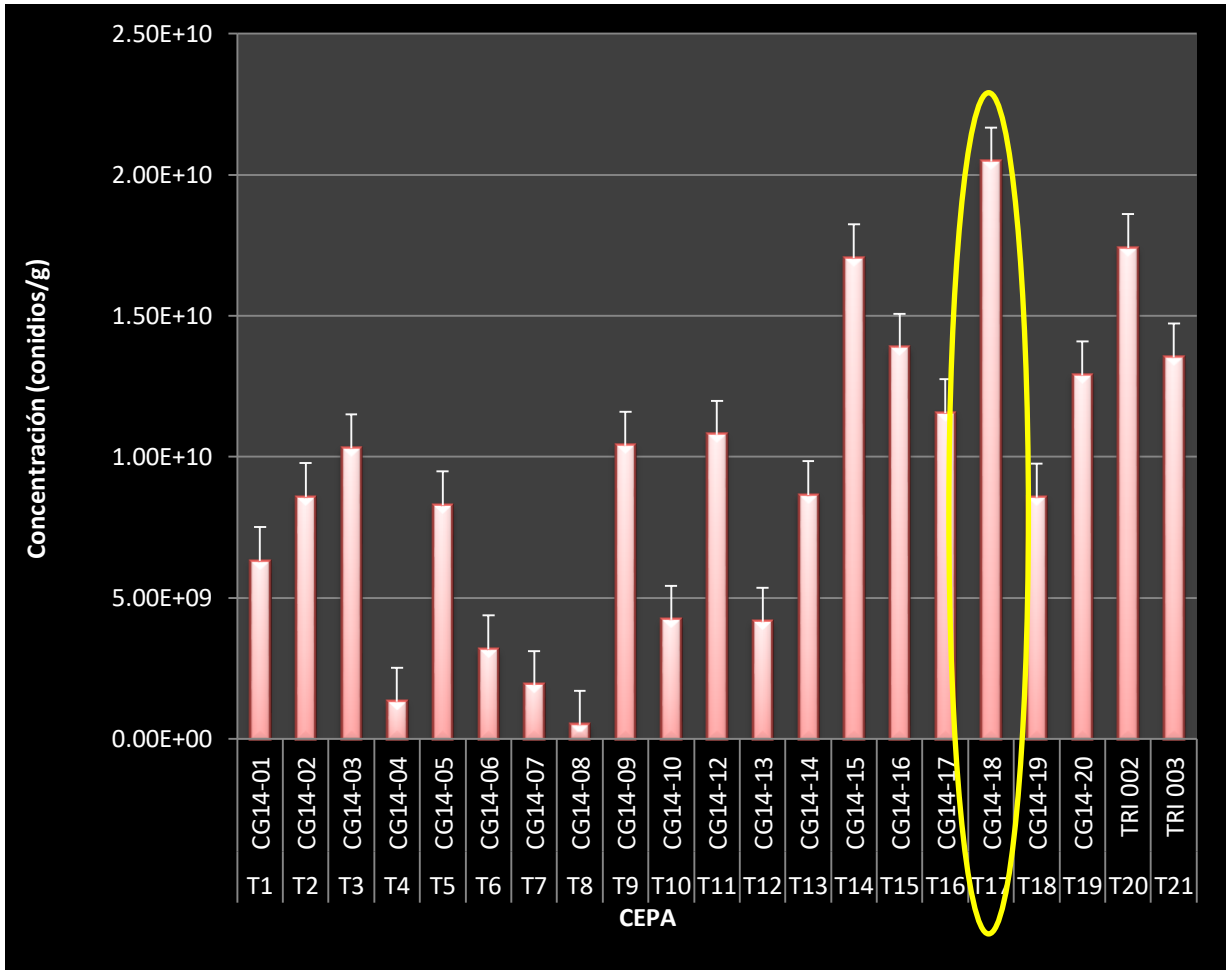


Figura 24. Gráfica de concentración de conidias para diferentes cepas evaluadas.

Cómo se observa en la figura anterior la cepa Cg 14-18 obtuvo mejores resultados en la producción de conidios de *Trichoderma* sp. obteniendo valores mayores a 2×10^{10} conidios por gramo.

Anteriormente en el Laboratorio de Microorganismos se realizaron conteos de las mismas cepas de *Trichoderma* sp. y el mejor resultado reportado fue la cepa Cg 14-18, con una producción de esporas de 9×10^7 conidios por gramo (Sandoval Aguirre, 2013). Como se puede observar los resultados varían bastante ya que el resultado obtenido en la figura 26 (concentración mayor a 2×10^{10} conidios por gramo) es mayor a la evaluación de Sandoval Aguirre, 2013.

Los resultados pudieron haber variado por la metodología utilizada en las diferentes investigaciones, ya que en la metodología que utilizó Sandoval Aguirre, 2013 pudo provocar que el hongo no esporulara de forma adecuada por muchos aspectos como: el tiempo de desarrollo del micelio y falta de humedad al hongo entre otros.

Es muy importante el tiempo de desarrollo de micelio y la aplicación de humedad constante ya que se puede obtener una mayor esporulación y obtener una concentración de conidios mucho más alta.

Es importante considerar la concentración de conidios que se aplica en el control biológico de fitopatógenos, entre mayor sean las concentraciones son mejores. Generalmente en trabajos de invernadero y campo se utiliza al menos una concentración de 1×10^8 conidios/g (Cooney, Lauren, Jensen, & Perry-Meyer, 1997).

En el cuadro 6 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de cepas de *Trichoderma* sp.

Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA) de concentración de conidias por gramo para las diferentes cepas.

	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	2431.36	121.568	51.253	1.9499×10^{-31}
Residuo	63	149.43	2.372		
Total	83	2580.79			
CV = 16.69%					

Al existir diferencia entre tratamientos se realizó la prueba de medias, utilizando el comparador ScottKnott, que se presenta en el cuadro 7.

Cuadro 7. Prueba de medias de ScottKnott de concentración de conidias por gramo para las cepas.

Grupos	Cepas	Tratamientos	Medias
a	Cg 14-18	T17	20.47
b	TRI 002	T20	17.40
b	Cg 14-15	T14	17.04
c	Cg 14-16	T15	13.87
c	TRI 003	T21	13.52
c	Cg 14-20	T19	12.90
d	Cg 14-17	T16	11.55
d	Cg 14-12	T11	10.77
d	Cg 14-09	T9	10.39
d	Cg 14-03	T3	10.32
e	Cg 14-14	T13	8.66
e	Cg 14-19	T18	8.55
e	Cg 14-02	T2	8.47
e	Cg 14-05	T5	8.30
e	Cg 14-01	T1	6.30
f	Cg 14-10	T10	4.23
f	Cg 14-13	T12	4.16
f	Cg 14-06	T6	3.16
g	Cg 14-07	T7	1.93
g	Cg 14-04	T4	1.33
g	Cg 14-08	T8	0.51

Como se puede observar en el cuadro 6 y 7 existe diferencia significativa entre tratamientos ya que se divide en siete grupos estadísticos, en donde se puede observar que la cepa Cg14-18 posee la media más alta seguido de la cepa TRI 02 y Cg 14-15 y la cepa que posee la media más baja es la cepa Cg 14-08.

2.6.2 Porcentaje de germinación o viabilidad

En el cuadro 8 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de germinación o viabilidad.

Cuadro 8. Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de germinación o viabilidad.

	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	3302.9	165.147	42.515	4.3703x10 ⁻²⁹
Residuo	63	244.7	3.884		
Total	83	3547.7			
CV = 2.21%					

Según el análisis de varianza realizado, se puede observar que existen diferencias altamente significativas, por lo que se realizó la prueba de medias, utilizando el comparador ScottKnott, que se presenta en el cuadro 9.

Cuadro 9. Prueba de ScottKnott para porcentaje de germinación o viabilidad.

Grupos	Cepas	Tratamientos	Medias
a	Cg 14-20	T19	97.12
a	Cg 14-19	T18	95.85
a	TRI 002	T20	95.62
a	Cg 14-18	T17	95.14
b	TRI 003	T21	92.35
b	Cg 14-14	T13	92.05
b	Cg 14-17	T16	91.59
b	Cg 14-16	T15	91.19
b	Cg 14-15	T14	90.73
b	Cg 14-05	T5	90.38
b	Cg 14-03	T3	90.26
b	Cg 14-04	T4	89.79
b	Cg 14-13	T12	89.76
b	Cg 14-02	T2	89.48
c	Cg 14-12	T11	88.95
c	Cg 14-07	T7	88.24
c	Cg 14-06	T6	86.96
c	Cg 14-01	T1	86.78
d	Cg 14-09	T9	82.46
d	Cg 14-10	T10	80.68
e	Cg 14-08	T8	67.31

Cómo se puede observar en el cuadro 9, existe diferencias altamente significativas entre tratamientos o cepas de *Trichoderma* sp. y se divide en cinco grupos estadísticos, en donde se puede observar que las cepas Cg 14-20, Cg 14-19, TRI 002 y Cg 14-18 poseen las medias más altas y la cepa que posee la media más baja es la cepa Cg 14-08.

De forma gráfica se puede apreciar en la figura 25 el comportamiento del porcentaje de germinación o viabilidad de cada cepa de *Trichoderma* sp..

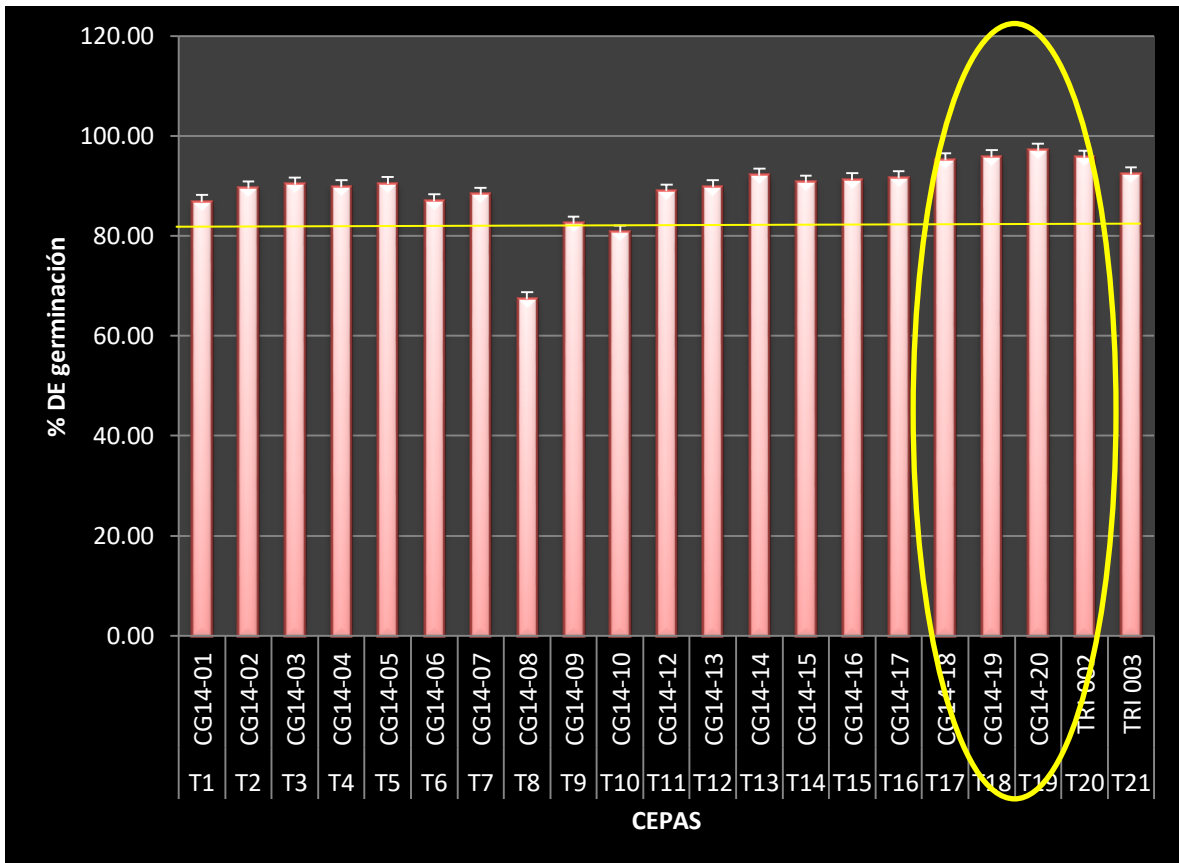


Figura 25. Gráfica del porcentaje de germinación o viabilidad.

En la figura 25 se observa que la mayoría de las cepas tiene un porcentaje de germinación mayor del ochenta por ciento, algunas de las cepas alcanza más del noventa por ciento, esto es provocado por el microorganismo teniendo un mayor porcentaje de conidios

germinados, es decir que el microorganismo está vivo y al ser aplicado en campo puede tener un mayor efecto.

Al observar los resultados de la concentración de cepas conidios por gramo, la cepa Cg14-18 es el que posee la media más alta seguido de la cepa TRI 002 y Cg 14-15. En los resultados del porcentaje de germinación de la figura 25, las cepas que presentaron las medias más altas fueron las cepas Cg 14-20, Cg 14-19, TRI 002 y Cg 14-18. La mejor cepa para aplicar en campo con una concentración mayor a 2×10^{10} y un porcentaje de germinación o viabilidad mayor al 95 % es la cepa Cg 14-18.

Se encuentran cepas que obtuvieron una menor concentración de conidios por gramo pero en el porcentaje de germinación la mayoría obtuvo un porcentaje mayor al 80 y 95 %, con excepción a la cepa Cg 14-08 con un porcentaje de germinación del 70 %, esto quiere decir que presentaron un alto grado de germinación de conidios.

2.6.3 Grado de antagonismo

El antagonismo *in vitro* entre *Trichoderma* sp. contra *Fusarium sacchari* fue realizado de acuerdo al método del cultivo dual que consiste en un enfrentamiento equitativo del hongo patógeno (*Fusarium sacchari*) y el hongo antagonista (*Trichoderma* sp.) cómo se señala en la metodología (Reyes et al. 2007).

Para obtener los resultados se utilizó la Escala de Bell, esta escala mide la capacidad antagónica del hongo antagonista (*Trichoderma* sp.) y el hongo patógeno (*Fusarium sacchari*) (cuadro 5).

En la figura 26 se puede observar la medición del crecimiento micelial del hongo patógeno (*Fusarium sacchari*) y el hongo antagonista (*Trichoderma* sp.), esto se realizó para saber cuánto micelio creció diariamente y se realizó por dos semanas y se finalizó hasta que la primera cepa cubrió el 100 % al hongo patógeno (*Fusarium sacchari*).

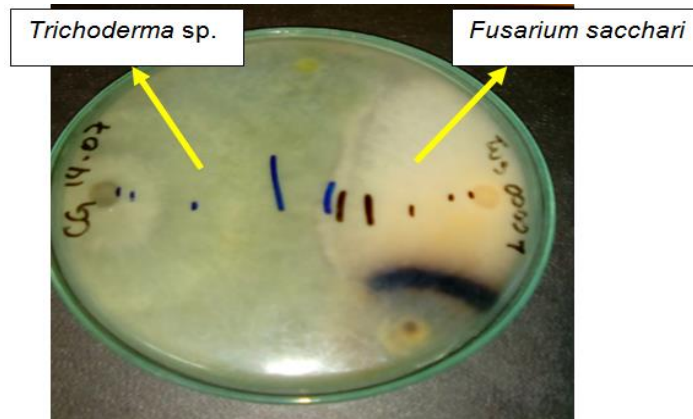


Figura 26. Fotografía de la medición del crecimiento micelial del patógeno y antagonista.

En la figura 27 se presenta gráficamente el grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari*.

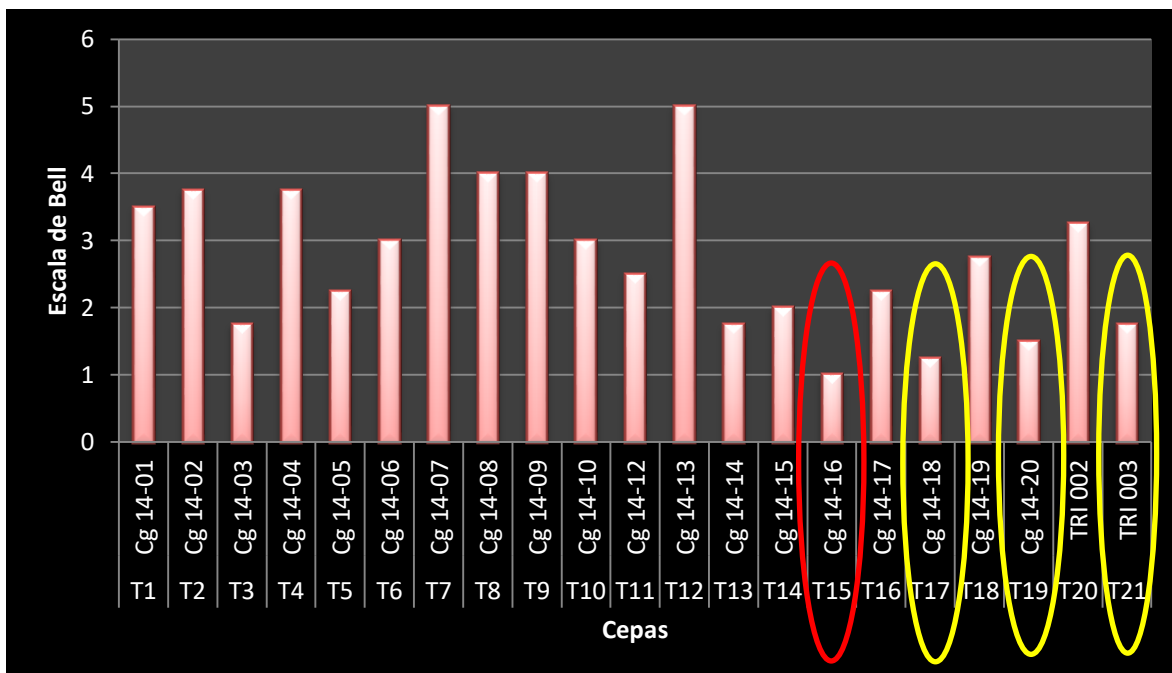


Figura 27. Gráfica de grado de antagonismo.

Cómo se puede observar en la figura 27 la cepa de *Trichoderma sp.* que sobrecreció sobre el patógeno (*Fusarium sacchari*) un 100 % fue la cepa Cg 14-16 seguidas de las cepas Cg 14-18, Cg 14-20, TRI 002 y TRI 003, esto quiere decir que si se quiere controlar

Fusarium sacchari un 100 % la primera cepa mencionada es la más recomendable, no descartando las otras mencionadas.

Por otro lado también se obtuvieron cepas de *Trichoderma* sp. que fueron invadidas por el patógeno (*Fusarium sacchari*), las cuales son la Cg 14-07 y la cepa Cg 14-13. Estas dos cepas de *Trichoderma* sp. fueron las más débiles al momento de enfrentarse contra *Fusarium sacchari* ya que fueron cubiertas un 100 %, por lo tanto no son recomendables para el control de *Fusarium sacchari*.

2.7 CONCLUSIONES

1. La cepa que obtuvo una mayor concentración de conidios por gramo fue la Cg 14-18 con una concentración de 2×10^{10} conidios por gramo, seguido por las cepas Cg 14-15 y TRI 002 con concentraciones de 1.7×10^{10} conidios por gramo.
2. La cepa que obtuvo un mayor porcentaje de germinación o viabilidad fue la Cg 14-20 con un 97.12 %, seguido de Cg 14-19 con un porcentaje de germinación o viabilidad del 95.85 %, TRI 002 con un porcentaje de germinación o viabilidad del 95.62 % y Cg 14-18 con un porcentaje de germinación o viabilidad del 95.14 %.
3. La cepa que posee mayor grado de antagonismo contra *Fusarium sacchari* es la Cg 14-16, seguido de las cepas Cg 14-18, Cg 14-20 y TRI 003 cubriendo al patógeno un 100 %.

2.8 RECOMENDACIONES

Con finalidad de obtener un manejo de la producción de *Trichoderma* sp. y validar los resultados de concentración de cepas, porcentaje de germinación o viabilidad y grado de antagonismo, se realizan las siguientes recomendaciones:

1. Durante el proceso de estructuras reproductivas en la bandeja es necesario aplicar agua con un atomizador y humedecer las bandejas en los primeros 2 días, esto con el fin de propiciar mayor esporulación.
2. Realizar movimiento del sustrato en la bandeja por cinco días para que el hongo se propague en los espacios y haya un mayor cubrimiento del hongo en el sustrato.
3. Realizar pruebas experimentales similares para realizar la producción de *Trichoderma* sp. para obtener la concentración de las diferentes cepas y el porcentaje de germinación o viabilidad.
4. Utilizar en campo la cepa Cg 14-18 y mostrar buen porcentaje de germinación, mayor concentración de conidias por gramo y un 100 % de antagonismo contra *Fusarium sacchari*.

2.9 BIBLIOGRAFÍA

1. Agosin, E., Volpe, D., Muñoz, G., San Martín, R., & Crawford, R. (1997). Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13, 225-232.
2. Agrios, G. N. (2008). *Fitopatología (2a ed.)*. México: Limusa.
3. Alvarez, S., & Sivila, N. (2013). *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar: producción artesanal de Trichoderma*. Obtenido de San Salvador de Jujuy, Argentina: Universidad Nacional de Jujuy, Universitaria de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias: <http://docplayer.es/12621011-Tecnologias-agroecologicas-para-la-agricultura-familiar-produccion-artesanal-de-trichoderma.html>
4. Bell, D., Wells, H., & Markham, C. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathol.*, 72, 379-382.
5. Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma* spp., infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357-2372.
6. Chávez García, M. P. (2006). *Producción de Trichoderma y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. (Tesis Microbiol. Ind.). Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias: Bogotá, Colombia: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
7. Cooney, Y. M., Lauren, D. R., Jensen, D. J., & Perry-Meyer, L. J. (1997). Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest on 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma* spp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 531-534.
8. Danielson, R. (1989). *Non nutritional factors affecting the growth of Trichoderma harzianum*. (Vol. 5). Soil. Biol. Biochem.
9. Del Cid, J. (2011). Localización de fincas Ingenio Magdalena (correo electrónico). Escuintla, Guatemala, Ingenio Magdalena, SIG. (Y. Véliz, Entrevistador)
10. Elías, R., Arcos, O., & Arbelaez, G. (1993). Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agron. Colomb.*, 10, 52-61.
11. Fernández-Larrea, V. O. (2004). *Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad.
12. Gamez, E., Zapata, R., Oveido, L., & Barrera, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (2), 23-34.

13. García, R., Salas, J., Riera, R., Zambrano, C., MAggionari, A., & García, A. (2005). Uso del antagonista *Trichoderma harzianum* para controlar tres enfermedades fungosas del suelo. *INIA Divulga*, enero-abril, 8-14.
14. Harman, G. (2006). The nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. *Symposium overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp.* (págs. 190-194). USA: The American Phytopathological Society.
15. Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. USA: Blackwell Publishing Professional.
16. Melgar, M., Meneses, A., Orozco, H. P., & Espinoza, R. (2014). *El cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala* (2012 ed.). Guatemala: Artemis Edinter.
17. Meneses Adlai; Melgar Mario; Orozco Héctor; Pérez Ovidio; Quemé José Luis; López de Alvarado Priscila. (2017). *Guía de Buenas Prácticas Agrícolas*. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de investigación y capacitación de la caña de azúcar).
18. Michel Aceves, A. C. (2001). *Cepas nativas de Trichoderma sp., Euascomycetos, su antibiosis y micoparasitismo sobre Fusarium subglutinans y F. oxysporum (Hyphomicetes: Hyphales)*. (Tesis PhD. Biotecnol.). Obtenido de Universidad de Colima: México:
http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.PDF
19. Molina Santos, E. (2006). *Manejo de plagas del follaje y patógenos de suelo del cultivo de pascual (Euphorbia pulcherrima Wild ex. Klotzsch) para exportación de esquejes, en la empresa Paul Ecke de Guatemala S.A. San Juan Alotenango, Sacatepéquez*. (Tesis Ing. Agr.). Obtenido de USAC, Facultad de Agronomía: Guatemala: <http://fausac.usac.edu.gt/tesario/tesis/T-02511.pdf>
20. Nelson, P. E., Digna, M. C., & Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 479-504.

3 ANEXOS

1 Datos de concentración de *Trichoderma* sp.

Cuadro 1A. Matriz de concentraciones de las cepas de *Trichoderma* sp.

No. Cepa	Repetición	Valores obtenidos (conidios/cuadrante)				Promedio	Factor de cámara	Volumen inicial (ml.)	No. De diluciones			Peso de muestra (gr.)	Conidios/gr.	Promedio
Cg 14-01	R1	120	158	129	124	132.13	10000	500	10	10	1	10	6.6E+09	6.3E+09
		126	128	140	132									
	R2	144	143	147	146	146.38	10000	500	10	10	1	10	7.3E+09	
		148	150	140	153									
	R3	122	122	115	162	124.63	10000	500	10	10	1	10	6.2E+09	
		125	122	107	122									
	R4	103	104	100	105	101.88	10000	500	10	10	1	10	5.1E+09	
		95	94	111	103									
Cg 14-02	R1	29	20	23	24	26.38	10000	500	10	10	6	10	7.9E+09	8.6E+09
		27	21	35	32									
	R2	26	19	23	48	26.63	10000	500	10	10	6	10	8.0E+09	
		21	27	22	27									
	R3	29	41	24	30	29.13	10000	500	10	10	6	10	8.7E+09	
		18	41	21	29									
	R4	28	36	21	34	32.25	10000	500	10	10	6	10	9.7E+09	
		39	35	37	28									
Cg 14-03	R1	28	27	35	33	32.50	10000	500	10	10	6	10	9.8E+09	1.0E+10
		30	33	40	34									
	R2	39	52	41	40	40.75	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		35	35	36	48									
	R3	23	36	30	40	31.25	10000	500	10	10	6	10	9.4E+09	
		34	35	20	32									
	R4	28	43	32	33	33.00	10000	500	10	10	6	10	9.9E+09	
		39	40	29	20									
Cg 14-04	R1	10	23	32	28	21.50	10000	500	10	10	1	10	1.1E+09	1.3E+09
		20	18	10	31									
	R2	29	31	49	53	34.50	10000	500	10	10	1	10	1.7E+09	
		31	24	29	30									
	R3	20	30	26	25	26.50	10000	500	10	10	1	10	1.3E+09	
		15	31	34	31									
	R4	20	26	16	10	23.38	10000	500	10	10	1	10	1.2E+09	

		18	30	33	34									
Cg 14-05	R1	21	19	28	24	27.50	10000	500	10	10	6	10	8.3E+09	8.3E+09
		32	29	30	37									
	R2	30	28	19	22	26.38	10000	500	10	10	6	10	7.9E+09	
		25	20	32	35									
	R3	26	20	24	18	28.88	10000	500	10	10	6	10	8.7E+09	
		39	29	36	39									
	R4	21	29	24	36	27.75	10000	500	10	10	6	10	8.3E+09	
		22	32	27	31									
Cg 14-06	R1	47	52	33	63	48.25	10000	500	10	10	1	10	2.4E+09	3.2E+09
		42	45	41	63									
	R2	70	84	75	89	76.88	10000	500	10	10	1	10	3.8E+09	
		85	68	83	61									
	R3	70	65	60	62	60.88	10000	500	10	10	1	10	3.0E+09	
		68	50	55	57									
	R4	63	65	78	69	67.88	10000	500	10	10	1	10	3.4E+09	
		75	79	52	62									
Cg 14-07	R1	30	50	38	34	40.13	10000	500	10	10	1	10	2.0E+09	1.9E+09
		47	39	35	48									
	R2	30	34	31	31	31.75	10000	500	10	10	1	10	1.6E+09	
		35	37	36	20									
	R3	40	50	43	53	50.25	10000	500	10	10	1	10	2.5E+09	
		59	52	60	45									
	R4	30	32	31	30	31.75	10000	500	10	10	1	10	1.6E+09	
		37	33	30	31									
Cg 14-08	R1	22	29	19	18	18.63	10000	500	10	6	1	10	5.6E+08	5.1E+08
		16	15	12	18									
	R2	22	11	10	12	16.13	10000	500	10	6	1	10	4.8E+08	
		21	27	14	12									
	R3	11	19	14	13	16.13	10000	500	10	6	1	10	4.8E+08	
		18	31	13	10									
	R4	15	10	15	15	16.63	10000	500	10	6	1	10	5.0E+08	
		18	14	25	21									
Cg 14-09	R1	40	25	30	25	30.75	10000	500	10	10	6	10	9.2E+09	1.0E+10
		33	30	30	33									
	R2	26	51	28	40	34.13	10000	500	10	10	6	10	1.0E+10	
		30	34	32	32									
	R3	37	46	35	30	35.50	10000	500	10	10	6	10	1.1E+10	
		34	37	31	34									

	R4	38	37	35	37	38.13	10000	500	10	10	6	10	1.1E+10	
		37	40	40	41									
Cg 14-10	R1	12	17	10	18	13.25	10000	500	10	10	6	10	4.0E+09	4.2E+09
		11	12	16	10									
	R2	20	11	15	19	16.25	10000	500	10	10	6	10	4.9E+09	
		18	14	17	16									
	R3	10	13	11	15	12.50	10000	500	10	10	6	10	3.8E+09	
		10	12	14	15									
	R4	15	12	15	19	14.38	10000	500	10	10	6	10	4.3E+09	
		16	14	11	13									
Cg 14-12	R1	41	37	35	39	37.13	10000	500	10	10	6	10	1.1E+10	1.1E+10
		42	31	36	36									
	R2	23	26	21	30	25.50	10000	500	10	10	6	10	7.7E+09	
		20	39	25	20									
	R3	45	45	46	45	45.38	10000	500	10	10	6	10	1.4E+10	
		47	51	35	49									
	R4	33	31	31	40	35.63	10000	500	10	10	6	10	1.1E+10	
		36	32	36	46									
Cg 14-13	R1	80	71	61	72	70.00	10000	500	10	10	1	10	3.5E+09	4.2E+09
		66	71	61	78									
	R2	115	95	101	93	103.63	10000	500	10	10	1	10	5.2E+09	
		100	105	111	109									
	R3	70	81	80	92	78.38	10000	500	10	10	1	10	3.9E+09	
		80	65	85	74									
	R4	64	94	66	77	80.63	10000	500	10	10	1	10	4.0E+09	
		90	78	94	82									
Cg 14- 14	R1	102	98	102	102	97.50	10000	500	10	10	1	10	4.9E+09	8.6E+09
		93	104	87	92									
	R2	217	238	208	226	228.63	10000	500	10	10	1	10	1.1E+10	
		237	242	219	242									
	R3	162	182	191	201	184.38	10000	500	10	10	1	10	9.2E+09	
		188	172	194	185									
	R4	167	183	171	157	181.25	10000	500	10	10	1	10	9.1E+09	
		192	188	178	214									
Cg 14-15	R1	50	40	63	46	50.13	10000	500	10	10	6	10	1.5E+10	1.7E+10
		46	49	64	43									
	R2	33	56	33	88	51.75	10000	500	10	10	6	10	1.6E+10	
		54	51	53	46									
	R3	51	107	69	58	66.88	10000	500	10	10	6	10	2.0E+10	

		62	63	65	60									
	R4	59	48	71	62	58.38	10000	500	10	10	6	10	1.8E+10	
		62	57	52	56									
Cg 14-16	R1	47	70	62	56	61.00	10000	500	10	10	6	10	1.8E+10	1.4E+10
		61	68	63	61									
	R2	37	35	33	39	38.75	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		40	46	42	38									
	R3	40	43	54	39	44.25	10000	500	10	10	6	10	1.3E+10	
		50	35	51	42									
	R4	37	41	55	34	40.88	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		40	39	41	40									
Cg 14-17	R1	31	38	39	45	37.00	10000	500	10	10	6	10	1.1E+10	1.2E+10
		33	32	36	42									
	R2	33	33	37	33	34.38	10000	500	10	10	6	10	1.0E+10	
		31	41	32	35									
	R3	45	34	41	38	40.63	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		38	37	43	49									
	R4	37	42	38	54	42.00	10000	500	10	10	6	10	1.3E+10	
		53	39	35	38									
Cg 14-18	R1	71	58	75	83	80.00	10000	500	10	10	6	10	2.4E+10	2.0E+10
		93	81	79	100									
	R2	65	64	64	73	71.25	10000	500	10	10	6	10	2.1E+10	
		65	87	78	74									
	R3	59	67	66	45	57.50	10000	500	10	10	6	10	1.7E+10	
		50	50	69	54									
	R4	50	60	60	90	64.13	10000	500	10	10	6	10	1.9E+10	
		62	65	56	70									
Cg 14-19	R1	21	27	20	29	21.50	10000	500	10	10	6	10	6.5E+09	8.6E+09
		20	18	16	21									
	R2	27	28	31	28	27.00	10000	500	10	10	6	10	8.1E+09	
		26	28	33	15									
	R3	36	39	24	38	32.38	10000	500	10	10	6	10	9.7E+09	
		30	30	31	31									
	R4	36	32	28	30	33.13	10000	500	10	10	6	10	9.9E+09	
		35	35	34	35									
Cg 14-20	R1	43	44	35	50	41.25	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	1.3E+10
		44	39	40	35									
	R2	55	55	43	48	50.25	10000	500	10	10	6	10	1.5E+10	
		59	48	40	54									

	R3	41	47	32	41	41.13	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		42	45	40	41									
	R4	43	37	45	48	39.25	10000	500	10	10	6	10	1.2E+10	
		30	30	40	41									
TRI 02	R1	50	46	55	60	55.38	10000	500	10	10	6	10	1.7E+10	
		62	57	53	60									
	R2	54	49	66	66	57.75	10000	500	10	10	6	10	1.7E+10	
		66	61	53	47									
	R3	53	63	70	67	63.38	10000	500	10	10	6	10	1.9E+10	
		66	71	55	62									
	R4	58	58	51	59	55.50	10000	500	10	10	6	10	1.7E+10	
		48	61	54	55									
TRI 03	R1	39	41	42	43	44.75	10000	500	10	10	6	10	1.3E+10	
		44	51	51	47									
	R2	37	44	33	48	49.38	10000	500	10	10	6	10	1.5E+10	
		66	53	74	40									
	R3	47	42	43	33	42.88	10000	500	10	10	6	10	1.3E+10	
		39	48	50	41									
	R4	35	33	53	38	43.25	10000	500	10	10	6	10	1.3E+10	
		54	51	40	42									



CAPÍTULO III

SERVICIOS PROFESIONALES REALIZADOS AL LABORATORIO DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS TECNICOS AGRICOLAS, ÁREA DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS. INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA C.A.

3.1 PRESENTACIÓN

Como parte del Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía y en respuesta a los requerimientos del área de Manejo Integrado de Plagas del Ingenio Magdalena, se planificaron y ejecutaron investigaciones durante el período de agosto 2016 a mayo 2017:

1. Evaluación de la Resistencia-tolerancia inducida por *Trichoderma sp.* a diferentes tipos de estrés abióticos en la caña de azúcar (*Saccharum sp.* Híbrido).
2. Evaluación de cuatro diferentes metodologías de dilución para el Conteo de conidias en el Hematócmetro o cámara de Neubauer aplicado al hongo *Metarhizium anisoplae*.
3. Evaluación de la mortandad y parasitismo inducida por *Beauveria bassiana* con diferentes aplicaciones al barrenador del tallo en caña de azúcar (*Diatraea sp.*).

Los informes de los proyectos se incluyen en los anexos 1, 2, y 3.

Anexo 1. Evaluación de la resistencia-tolerancia inducida por *Trichoderma sp.* a diferentes tipos de estrés abióticos en la caña de azúcar (*Saccharum sp.* Híbrido).

1 Resumen

Se evaluó la resistencia-tolerancia de las cepas de *Trichoderma sp.* La evaluación se realizó en dos ensayos. El primero se evaluaron 21 cepas *in vitro*, se sembró una esferita de sílicagel en el centro de cada caja petri con medio de PDA (Potato-Dextrose-Agar) en concentraciones de 25 mM, 50 mM, 75 mM, y 1 Molar de NaCl y se tomaron datos del crecimiento micelial. Las cepas que se seleccionaron para realizar el ensayo *in vivo* son aquellas que obtuvieron el mayor crecimiento micelial en el medio de PDA con la concentración de 1 Molar de NaCl, siendo las siguientes: CG 14-01, CG 14-02, CG 14-03 y CG 14-20. Se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar, con 3 repeticiones, la unidad experimental está conformada por nueve macetas (de 5 libras) y en cada una sembró una plántula de caña variedad CP 97-1931. Estas se colocaron al ambiente por 15 días, agregando 100 mL de agua en la mañana y tarde, al adaptarse las plántulas se llevó a cabo la inoculación de las cepas.

A cada maceta se le agregó 5 cc de inóculo con una concentración de 1×10^7 conidias/mL, se contó con un testigo absoluto, sólo se agregó agua salina y al testigo relativo sólo agua; durante dos semanas se agregó por las mañanas y tarde a cada maceta 100 cc de la solución salina (NaCl) a una concentración de 150 mili Molar (menos al testigo relativo, sólo se agregó agua).

Otras dos semanas, se regó sólo con solución salina (menos al testigo relativo), para observar cómo afecta la sal a la planta y la resistencia que le da *Trichoderma* a la planta cuando se le agrega solución salina. Al terminar de agregar la solución salina a las plantas, se dejaron por 5 días sin riego, para observar que tanto afectó el estrés a la planta.

En los resultados del estrés salino, el tratamiento que brindó mayor crecimiento de longitud de tallo y promovió mayor crecimiento en la longitud de raíz fue el testigo absoluto. Al obtener el peso húmedo de tallo y hojas, se observó que las mejores cepas de *Trichoderma* sp. que brindaron mayor peso a las plántulas de caña fueron la cepas Cg 14-03 y Cg 14-20.

Los tratamientos que obtuvieron mayor peso seco tallo y hojas (g) fueron: testigo absoluto y testigo relativo. La cepa de *Trichoderma* sp. relacionada con peso seco en raíz (g) fue la cepa Cg 14-20.

2 Introducción

La caña de azúcar es un cultivo adaptado a climas tropicales y subtropicales. Esta especie tiene una gran capacidad de producción de biomasa por unidad de superficie y presenta elevados requerimientos de agua y nutrientes para alcanzar los máximos rendimientos (Digonzelli & Romero, La caña de azúcar y la disponibilidad hídrica, 2014).

El estrés hídrico produce en el cañaveral alteraciones que afectan la expansión foliar y el desarrollo radicular, limitando la absorción de agua y nutrientes y la actividad fotosintética, factores que restringen severamente el crecimiento. El grado de daño depende de la intensidad y oportunidad del estrés sufrido por el cultivo (Digonzelli & Romero, La caña de azúcar y la disponibilidad hídrica, 2014),

Para la mayoría de las plantas, incluyendo las de importancia agrícola, la presencia de sal disminuye la absorción de agua y de los nutrientes importantes del suelo, y una vez acumulado dentro de la planta, el sodio es tóxico para una variedad de procesos metabólicos, incluyendo enzimas que participan en la fotosíntesis (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014).

Este estudio se realizó en la Finca San Patricio, del Municipio de la Democracia, Escuintla, con el propósito de evaluar las cepas de *Trichoderma* sp. para observar el efecto que tiene las mismas ante el estrés salino e hídrico.

3 Marco conceptual

3.1 Cultivo de la caña de azúcar

Es originaria de Nueva Guinea y esta fue llevada hacia islas cercanas de China y la India. La caña de azúcar es una gramínea del género *Saccharum*, es una especie que se caracteriza por el desarrollo de su sistema vegetativo subterráneo del cual nace gran número de tallos y a los cuales en conjunto se le llama “cepa”. En su madurez tiene la mitad de su biomasa en forma de fibra y azúcares (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México (SAGARPA), 2015).

3.2 Salinidad en el suelo

La salinidad es la consecuencia de la presencia de sales solubles en altas concentraciones, ya que por sus propias características las sales se pueden encontrar tanto en la fase sólida como en la fase líquida. Por esta razón tiene una extraordinaria movilidad en el suelo (Lutenberg, La salinidad y su influencia en suelos y plantas).

El proceso de acumulación de sales en el suelo está relacionado con el proceso de evaporación; la historia ha demostrado que la agricultura regada no puede sobrevivir sin un manejo apropiado de la sal (Lutenberg, La salinidad y su influencia en suelos y plantas).

3.3 La salinidad produce estrés hídrico, osmótico-hídrico, nutricional y oxidativo en plantas.

Osmótico: En condiciones de salinidad, se sufre un estrés osmótico por la gran concentración de solutos disueltos en la zona radicular. Entre más solutos existan más se reduce el potencial del soluto o potencial osmótico (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014).

Hídrico: El potencial hídrico se define como el estado de energía libre de las moléculas de agua y depende principalmente del potencial del soluto, por lo que la salinidad disminuye el potencial del soluto, por lo tanto también se reduce el potencial hídrico del suelo, lo que significa que las moléculas de agua irán de una solución menos concentrada (célula) a una más concentrada (suelo), resultando en plasmólisis (disminución de turgencia de la planta). Por ello se habla que la salinidad es un problema osmótico que provoca un estrés por déficit hídrico (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014).

Iónico: La excesiva absorción de Na^+ y Cl^- pueden ayudar al potencial osmótico de las células de la planta, aunque desencadena problemas de toxicidad si estos iones no son compartimentalizados, exportados o secretados apropiadamente (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014).

Nutricional: Afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas por la disminución de la absorción de K^+ , NO_3^- y agua (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014).

Oxidativo: Todos los estreses anteriores causan estrés Oxidativo (Barkla, Vera-Estrella, Balderas, & Pantoja, Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas, 2014)

3.4 Importancia de los microorganismos en el suelo

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes, ya que son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo del suelo. En un gramo de tierra, se encuentran millones de microorganismos benéficos para los cultivos. Estos microorganismos actúan a la vez como agentes de control biológico, que reducen aquellos microorganismos indeseables en el suelo y favorece los organismos útiles para los cultivos, con lo que aumenta la producción de la planta (Cervantes Flores, Microorganismos del suelo y su importancia para los cultivos, 2017).

Existen muchos hongos en el suelo que son beneficiosos para las plantas. Un hongo, está constituido por una serie de filamentos más o menos anchos, que se les denomina hifas. Al conjunto de hifas del hongo, se le denomina micelio (Cervantes Flores, Microorganismos del suelo y su importancia para los cultivos, 2017).

La forma de reproducción de los distintos hongos se realiza mediante las esporas, que se producen en los cuerpos fructíferos. La espora para un hongo, es algo similar a la semilla para una planta. El ciclo de vida de los distintos hongos que producen enfermedades en las plantas, es muy diferente de unos a otros. Todos comienzan con una espora que al germinar, produce una serie de hifas, que producirán una serie de cuerpos fructíferos, generándose nuevas esporas (Cervantes Flores, Microorganismos del suelo y su importancia para los cultivos, 2017).

3.5 Hongos del género *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* está compuesto por hongos que se encuentran presentes en forma natural, en casi todos los suelos y hábitats del planeta.

Es un Deutoromiceto perteneciente al grupo de los Hifomicetos y se caracteriza por desarrollarse rápidamente y emite gran cantidad de esporas de color verde. Es un hongo que frecuentemente se encuentra sobre madera y tejidos vegetales en

descomposición. Es un organismo dominante en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con la abundante microflora circundante (Cervantes Flores, Microorganismos del suelo y su importancia para los cultivos, 2017).

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia-tolerancia de la planta de caña de azúcar a la inducción del estrés salino e hídrico en presencia de *Trichoderma sp.*

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la resistencia-tolerancia inducida por *Trichoderma sp.*, al estrés salino.
2. Determinar la resistencia-tolerancia inducida por *Trichoderma sp.*, al estrés hídrico.

5 Materiales y métodos

5.1 Ensayo *in vitro* (selección de microorganismos para el ensayo *in vivo*)

5.2 Microorganismos y condiciones del medio

Para realizar el ensayo se utilizaron las cepas del hongo saprófito *Trichoderma sp.*; estas fueron obtenidas del Laboratorio de Microorganismos, Ingenio Magdalena S.A., La Democracia, Escuintla, Guatemala, C.A. Las cepas que fueron utilizadas se presentan en el cuadro 1:

Cuadro 1. Cepas de *Trichoderma sp.*, obtenidas del Laboratorio de Microorganismos, para ser utilizado en el ensayo *in vitro*.

Cepas					
1	Cg 14-01	8	Cg 14-08	15	Cg 15-16
2	Cg 14-02	9	Cg 14-09	16	Cg 15-17
3	Cg 14-03	10	Cg 14-10	17	Cg 15-18
4	Cg 14-04	11	Cg 14-12	18	Cg 15-19
5	Cg 14-05	12	Cg 14-13	19	Cg 15-20
6	Cg 14-06	13	Cg 14-14	20	TRI 002
7	Cg 14-07	14	Cg 14-15	21	TRI 003

Fuente. Elaboración propia

Las cepas son puras y están conservadas en sílicagel en una cámara refrigerada con una temperatura de 4 °C, las cepas se colocaron en sílicagel para conservarlas, ya que fueron obtenidas de campo.

Las cepas se purificaron sembrando en medio de PDA, obteniendo las cajas germinadas libre de contaminación, luego se colocó una porción de micelio germinado en una solución de leche descremada al 4 %; se agregó esa solución a la sílicagel, dándole movimientos al tubo y colocándolo a baño maría para que la sílicagel absorba la solución. Cada tubo está debidamente tapado con rosca. Si el tubo no contiene rosca se le coloca una bolita de algodón, luego se sella con parafilm y aluminio, esto se realiza para que no ingrese humedad, ya que al ingresar humedad a la sílica ésta cambia de color y se pierde el hongo preservado. Con este método de conservación le da un tiempo de vida largo al hongo.

Se sembró una esferita de sílicagel en el centro de cada caja petri con medio de PDA (Potato-Dextrose-Agar) en concentraciones de 25, 50, 75 mM, y 1 Molar de NaCl, teniendo en la sala una temperatura controlada de 25 °C.

Al día siguiente de haber sembrado *Trichoderma sp.*, se tomó datos de crecimiento micelial, ya que este es un hongo que tiene un crecimiento demasiado rápido. El crecimiento micelial se midió todos los días. Este se midió con una regla, marcando

siempre hasta donde se tomó el dato anterior; en este caso se dejó de tomar datos cuando se observó que una de las cajas de cada concentración llenó toda la caja petri; no importa si algunas cajas no se llenaron por completo, ya que las concentraciones de NaCl son distintas y cada cepa tuvo una reacción diferente a las concentraciones de NaCl.

Los datos sobre el crecimiento de *Trichoderma* en las distintas concentraciones de medio salino, se compararon con el crecimiento de las cepas con un medio de PDA, estas fueron procesadas con el software R. El conjunto de datos repetidos se analizaron por separado y sólo se mostraron los datos de las repeticiones que tenían una tendencia similar.

Las cepas que se seleccionaron para realizar el ensayo *in vivo* son las cepas que obtuvieron el mayor crecimiento micelial en PDA con la concentración de 1 Molar de NaCl.

5.3 Ensayo in vivo

5.3.1 Plántulas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

La caña utilizada para el ensayo fue tipo pilón variedad CP 97-1931, en la cual se plantaron en macetas de 5 libras, colocando una plántula por maceta. Por 15 días se dejaron las plántulas en adaptación al ambiente, ya que las plántulas estaban en un ambiente controlado de invernadero, por lo tanto se les agregó diariamente; 100 mL de agua en la mañana y en la tarde, se limpió el área donde se montó el ensayo para no tener contaminación de malezas.

El ensayo *in vivo* fue montado en una pequeña parcela, que se encuentra a un costado del Laboratorio de Microorganismos.

Del ensayo *in vitro* se seleccionaron las cepas: CG 14-01, CG 14-02, CG 14-03 y CG 14-20, las cuales conjuntamente se realizó un testigo absoluto (sólo se agregó agua salina) y un relativo (sólo se agregó agua), constituyeron los tratamientos.

Estos se evaluaron utilizando un diseño experimental bloques completamente al azar con 3 repeticiones, la unidad experimental la conformaron 9 macetas con una planta de caña, inoculado con las cepas a una concentración de 1×10^{07} conidias/mL.

El método de riego del experimento se explica a continuación: Al día siguiente de la inoculación se comenzó a regar por la mañana, con una solución de agua con NaCl a una concentración de 150 mM. Se agregó a cada maceta 100 cc de la solución salina (menos al tratamiento 6, sólo se agregó agua) y en la tarde se le agregó 100 cc de agua, por dos semanas, luego por otras dos semanas más, se regó sólo con la solución salina (menos al tratamiento 6), para observar que tanto le afecta la sal a la planta y que tanta resistencia le da *Trichoderma* a la planta cuando se le agrega la solución salina. Al terminar de agregar la solución salina a las plantas, se dejaron por 5 días sin riego, para observar que tanto afectó el estrés hídrico en la planta.

Se levantó el ensayo, sacando las plántulas de las macetas, lavando las raíces para que no quedaran residuos de tierra, se tiene el peso húmedo de tallo y raíz, se midió el tallo y la raíz de cada plántula y se colocaron en sobres de papel craft y llevaron al horno por tres días para obtener peso seco de cada plántula.

5.4 Análisis estadístico

Los datos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* se sometieron a la prueba de normalidad y análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Scott-Knott ($P=0.05$) para la obtención de las cepas para el ensayo *in vitro* e *in vivo*. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R (R Core Team, 2013).

6 Resultados y discusión

6.1 Ensayo *in vitro* (selección de microorganismos para el ensayo *in vivo*)

Las cepas de *Trichoderma* sp. que obtuvieron mayor crecimiento micelial en medio salino (25 mM NaCl) fueron: Cg 14-05, Cg 14-20, TRI 02 y TRI 03), en la cual hubo diferencia significativa entre cepas (p -value: 4.9085×10^{-12}) (Figura 1).

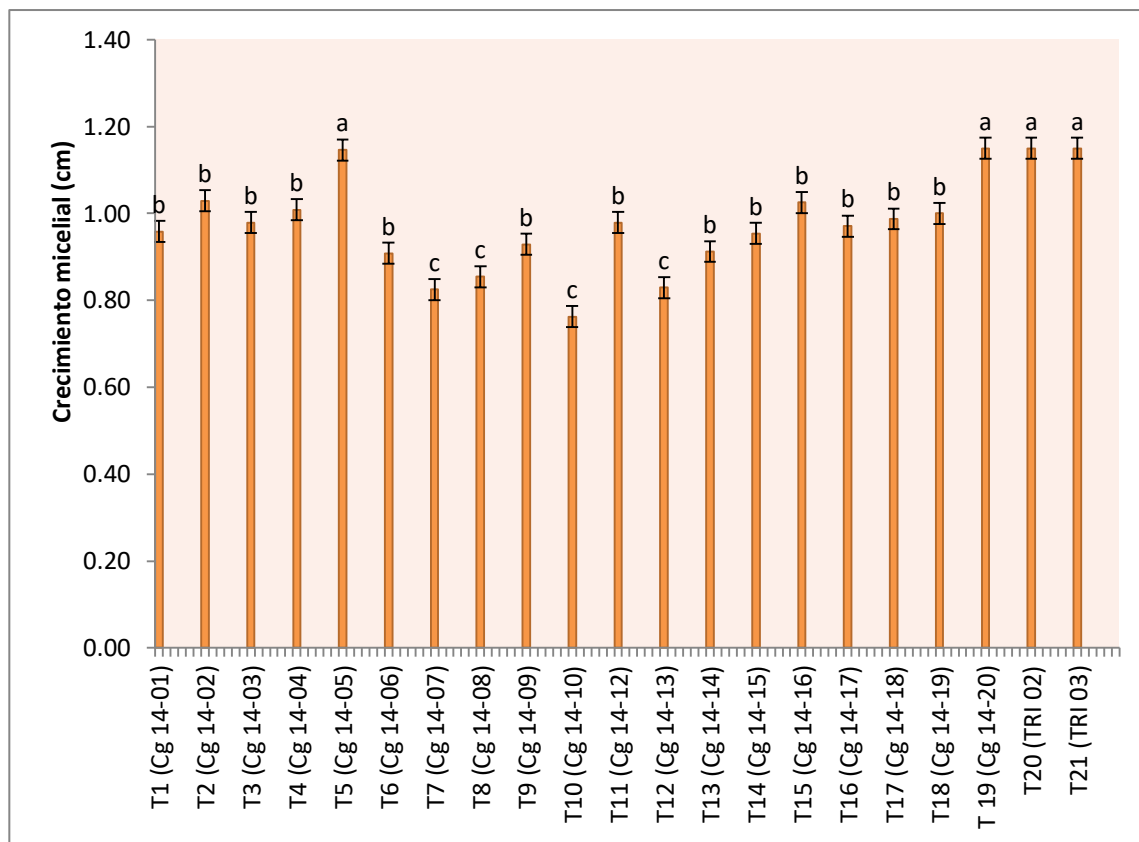


Figura 1. Gráfica del Índice de Crecimiento Micelial (ICM) en medio salino 25 mM NaCl.

El crecimiento micelial de *Trichoderma* en medio salino (50 mM NaCl) fueron: TRI 02, seguido de Cg14-02, y Cg 14-05, en la cual hubo diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 1.9122×10^{-20}) (Figura 2).

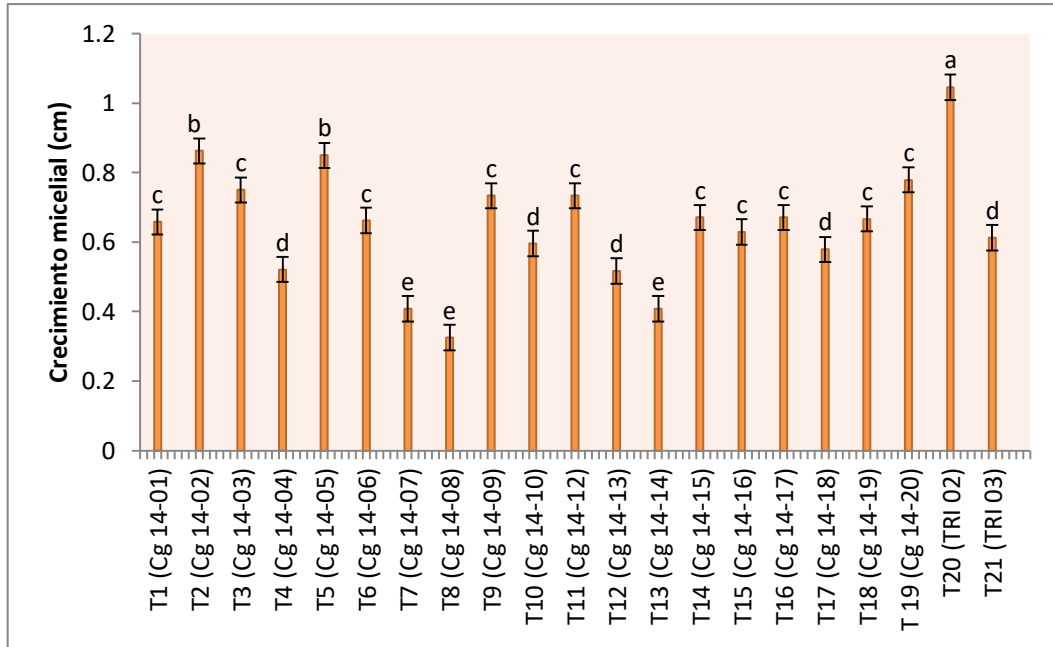


Figura 2. Gráfica del Índice de Crecimiento Micelial (ICM) en medio salino 50 mM NaCl.

La cepa de *Trichoderma* sp. que obtuvieron mayor crecimiento micelial en medio salino (75 mM NaCl) fue: Cg 14-10, ya que hubo diferencia significativa entre tratamientos (P-value: 1.3772×10^{-37}) (Figura 3).

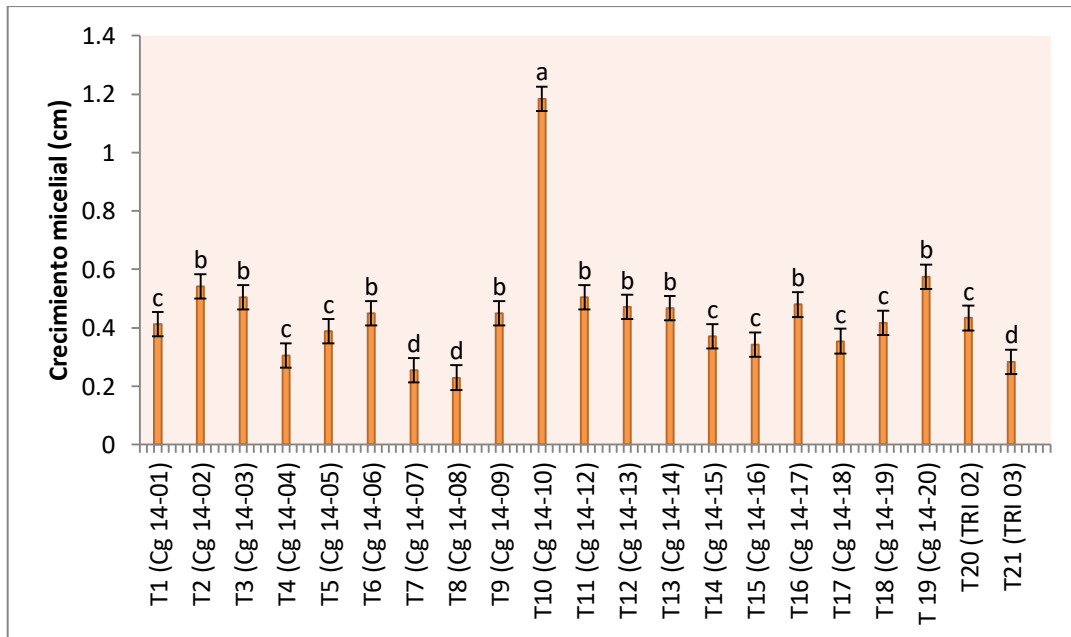


Figura 3. Gráfica del Índice de Crecimiento Micelial (ICM) en medio salino 75 mM NaCl.

El crecimiento micelial en medio salino (1 Molar NaCl) fue la cepa Cg 14-01, seguido de Cg 14-20, Cg 14-03 y Cg 14-02, presentando diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 1.3772×10^{-37}) (Figura 4).

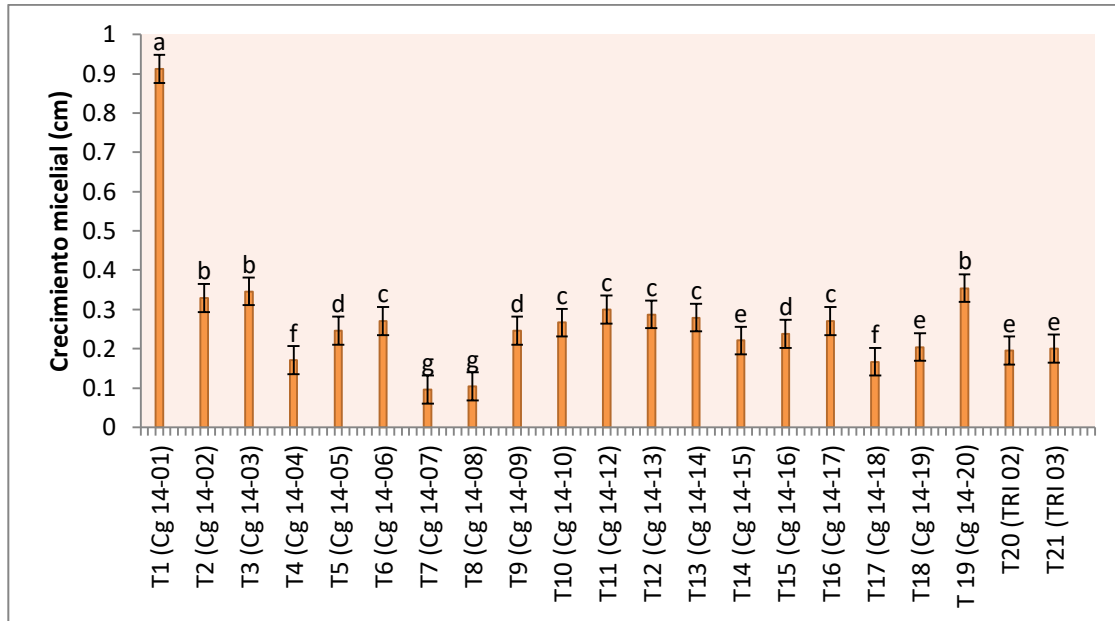


Figura 4. Gráfica Índice de Crecimiento Micelial (ICM) en medio salino 1M NaCl.

Para realizar el ensayo *in vivo* se seleccionaron las cepas que obtuvieron mayor crecimiento micelial en medio salino (1 Molar NaCl): Cg 14-01. Cg 14-20, Cg 14-03 y Cg 14-02.

6.2 Ensayo in vivo

6.2.1 Estrés salino de la planta

El tratamiento que brindó mayor crecimiento de longitud de tallo de caña de azúcar fue el testigo absoluto, en la cual obtuvo diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 0.35041) (Figura 5).

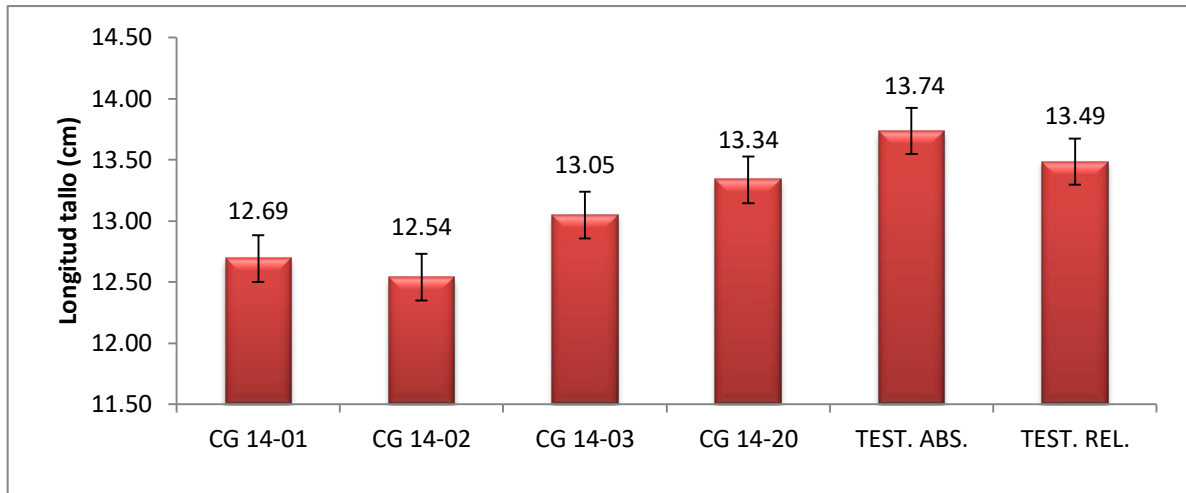


Figura 5. Gráfica de longitud del tallo de caña de azúcar (cm).

El tratamiento que promovió mayor crecimiento en la longitud de raíz de caña de azúcar fue el testigo absoluto, ya que obtuvo diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 0.069178) (Figura 6).

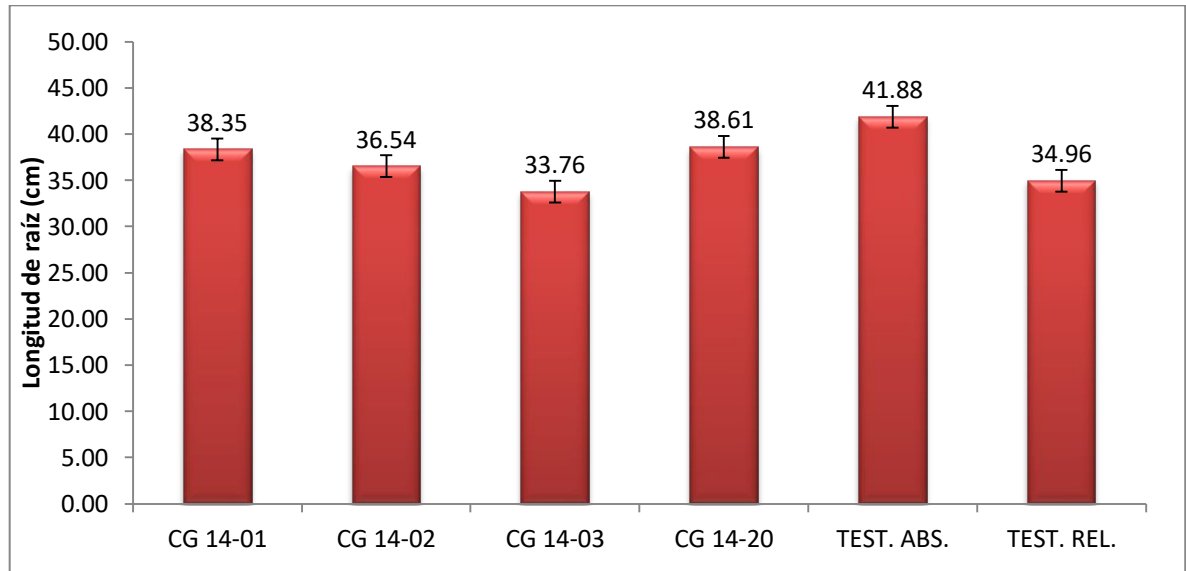


Figura 6. Gráfica de longitud de raíz de caña de azúcar (cm)

Al obtener el peso húmedo de tallo y hojas de caña de azúcar se observó que las mejores cepas de *Trichoderma* sp. que relacionados mayor peso a las plántulas de caña fueron

Cg 14-03 y Cg 14-20 teniendo diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 0.53623) (Figura 7).

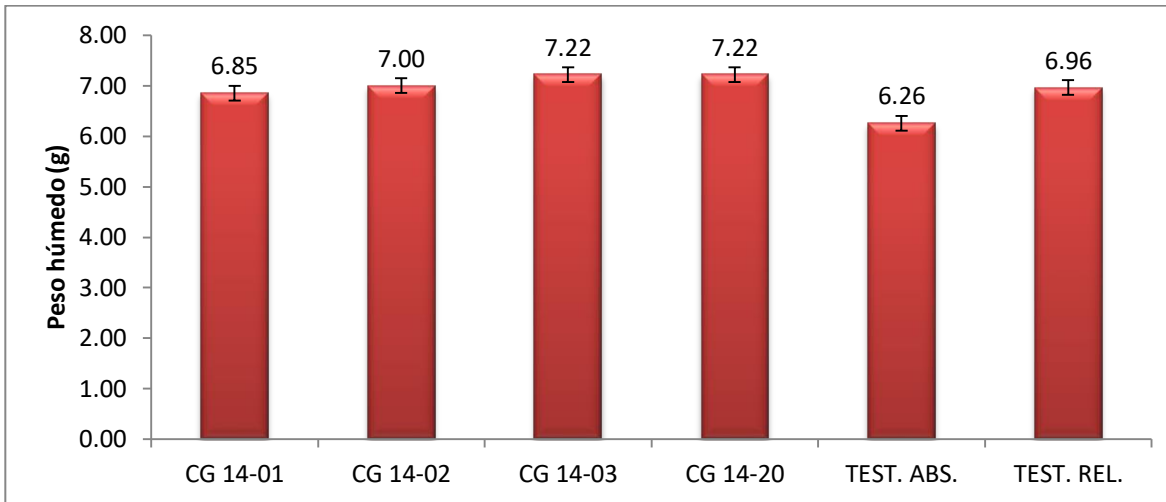


Figura 7. Gráfica de peso húmedo de tallo y hojas de caña de azúcar (g).

Las cepas relacionadas con el peso húmedo de raíz de caña de azúcar, presentaron diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 0.32173) (Figura 8).

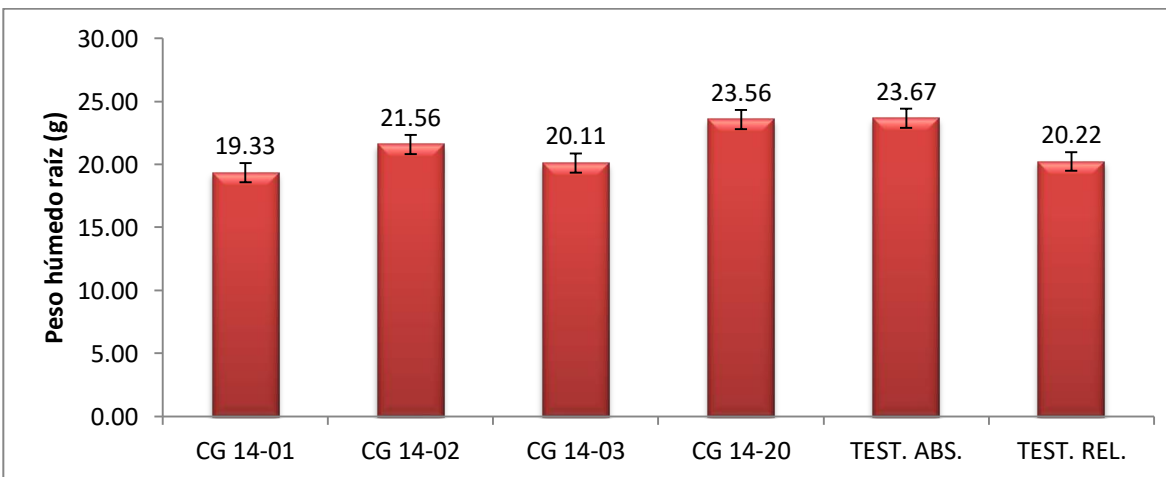


Figura 8. Gráfica de peso húmedo de caña de azúcar (g).

La cepa que promovió mayor peso húmedo a la planta de caña de azúcar fue la cepa Cg 14-20, ya que obtuvo ya que obtuvo un peso de 30.78 g. (Figura 9).

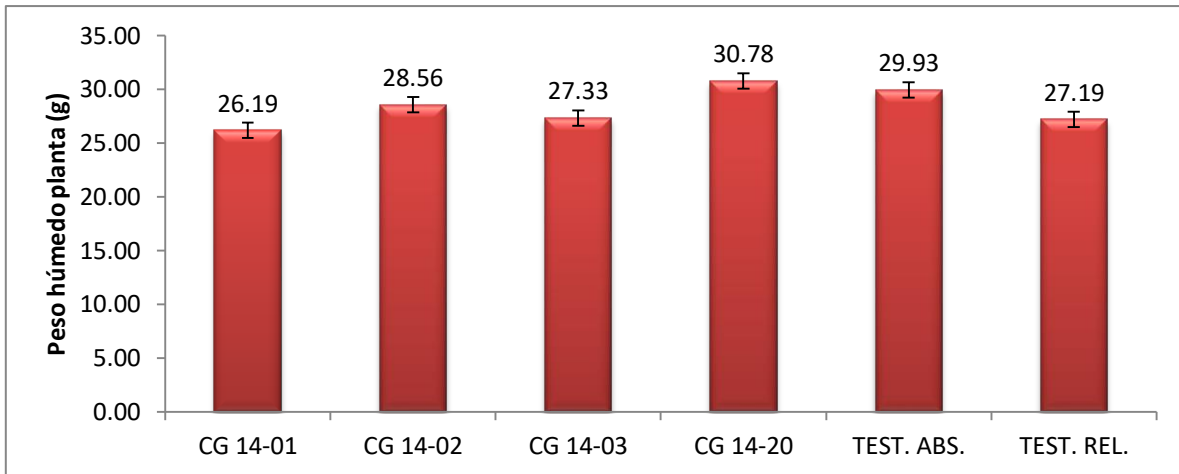


Figura 9. Gráfica de peso húmedo de la planta de caña de azúcar (g).

El coeficiente de variación de todos los parámetros fue menor a 20 %, lo que quiere decir que los tratamientos fueron manejados homogéneamente, también se realizó la prueba de medias con todos los parámetros.

6.2.2 Estrés hídrico

El testigo absoluto y testigo relativo presentaron mayor peso seco tallo y hojas de caña de azúcar (g), presentando diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 0.39940) (Figura 10).

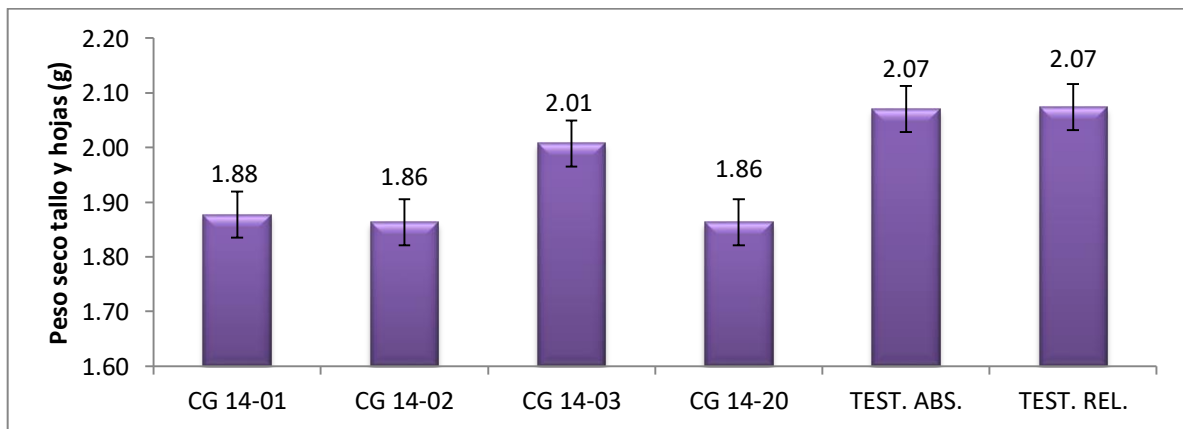


Figura 10. Gráfica de peso seco tallo y hojas de caña de azúcar (g).

La cepa de *Trichoderma* sp. que relacionado con el peso seco en raíz de caña de azúcar (g) fue: Cg 14-20, teniendo diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 0.2306) (Figura 11).

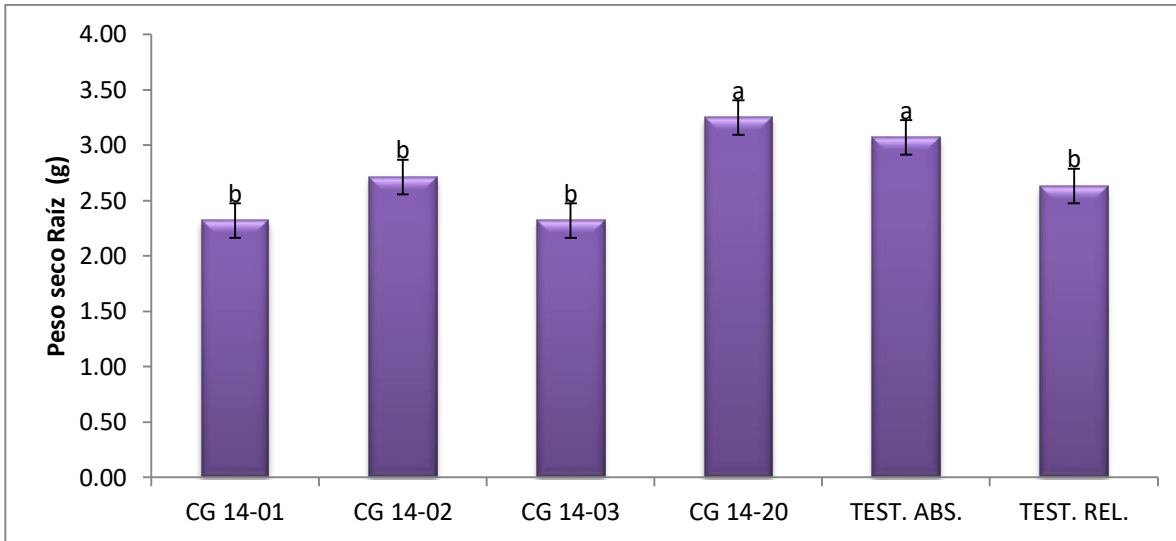


Figura 11. Gráfica de peso seco raíz de caña de azúcar (g).

La cepa de *Trichoderma* sp. que tuvo mayor peso seco de la planta de caña de azúcar (g) es la Cg 14-20, teniendo diferencia significativa entre tratamientos (p-value: 0.00191) (Figura 12).

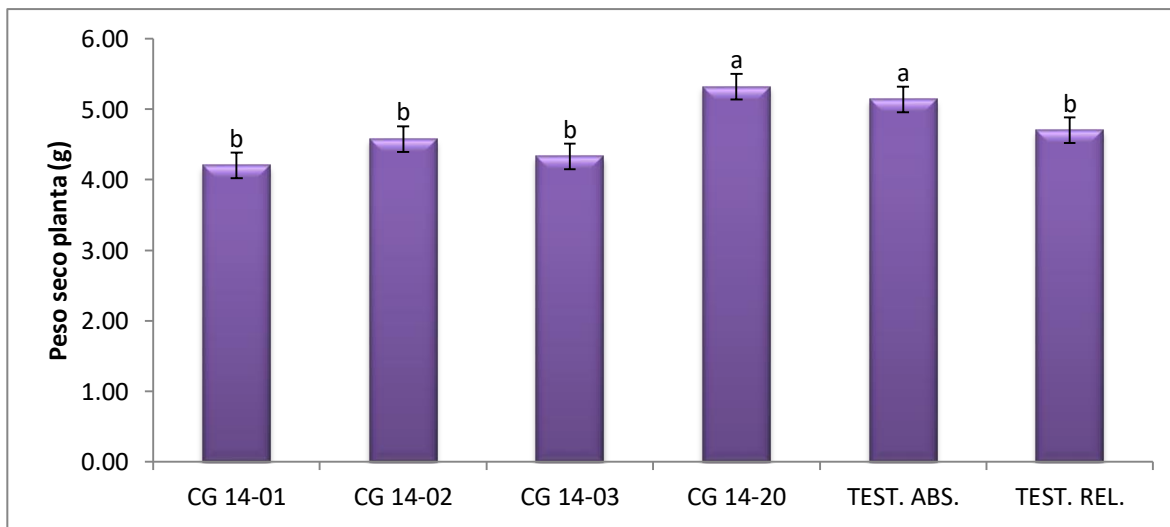


Figura 12. Gráfica de peso seco de la planta de caña de azúcar (g).

7 Conclusiones

1. La aplicación de *Trichoderma* sp. promovió el crecimiento de la plántula de la caña (variedad CP 97-1931) y se observó en las raíces, al aplicarle la solución salina se observó que hubo cambios en las hojas de las plántulas más no afectó mucho en gran parte a la planta, pero al observar las plántulas cuando se sometieron al estrés hídrico se observó que sí les afectó la ausencia de agua ya que la planta se empezó a marchitar.
2. La Cepa Cg 14-20 fue el tratamiento que presentó mayor resistencia al estrés salino inducido por *Trichoderma* sp. seguido del testigo absoluto.
3. La Cepa Cg 14-20 fue el tratamiento que presentó mayor resistencia al estrés hídrico inducido por *Trichoderma* sp. según el análisis de varianza presenta diferencia significativa (p-value: 0.00191) ante los demás tratamientos, seguido del testigo absoluto.

8 Recomendaciones

1. Evaluar los mismos tratamientos en el mismo sitio estudiado aumentando la concentración y dosis de solución salina, para observar cambios efectuados en la plántula conforme al tiempo.
2. Aumentar la dosis de las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. a las plántulas de caña, para observar si hay más cambios en la planta conforme al tiempo.
3. Aumentar el tiempo de vida del ensayo *in vivo* para poder obtener resultados más variables.

9 Bibliografía

1. Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Balderas, E., & Pantoja, O. (2014). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. En *Bioteología* (págs. 263-272). México: UNAM, Instituto d Biotecnología.
2. Cervantes Flores, M. Á. (2017). *Microorganismos del suelo y su importancia para los cultivos*. Obtenido de InfoAgro: http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm
3. Digonzelli, P., & Romero, E. R. (2014). La caña de azúcar y la disponibilidad hídrica. *Avance Agroindustrial*, 34 (4), 14-15.
4. Lutenberg, O. (s.f.). *La salinidad y su influencia en suelos y plantas*. Obtenido de Autoridad Nacional del Agua, Perú: <http://www.ana.gob.pe/media/496359/salinidad.pdf>
5. R Core Team. (2013). *R: Language and environment for stistical computing*. USA: R Foundation for Statistical Computing.

10 Anexos

1. Ensayo *in vitro*

1.1 25 mM NaCl

Cuadro 2A. Análisis de varianza ensayo *in vitro* concentración 25 mM NaCl

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	1.4368	0.071842	7.0822	4.91x10 ⁻¹²
Residuo	105	1.0651	0.010144		
Total	125	2.509			
CV= 10.29 %					

Cuadro 3A. Prueba de Shapiro-Wilk ensayo *in vitro* concentración 25 mM NaCl

p-valor:	1.04x10 ⁻¹⁶
Atención:	a 5% de significancia, los residuos no pueden considerarse normales

Cuadro 4A. Prueba de Scott-Knott ensayo *in vitro* concentración 25 mM NaCl

Grupos	Cepas	Medias
a	Cg 14-20	1.15
a	TRI 001	1.15
a	TRI 002	1.15
a	Cg 14-05	1.15
b	Cg 14-02	1.03
b	Cg 14-16	1.03
b	Cg 14-04	1.01
b	Cg 14-19	1.00
b	Cg 14-18	0.99
b	Cg 14-12	0.98
b	Cg 14-03	0.98
b	Cg 14-07	0.97
b	Cg 14-01	0.96
b	Cg 14-15	0.96
b	Cg 14-09	0.93
b	Cg 14-14	0.92
b	Cg 14-06	0.91
c	Cg 14-08	0.86
c	Cg 14-13	0.83
c	Cg 14-07	0.83
c	Cg 14-10	0.77

1.250 mM NaCl**Cuadro 5A.** Análisis de varianza ensayo *in vitro* concentración 50 mM NaCl

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	3.293	0.164667	13.249	1.91x10 ⁻²⁰
Residuo	105	1.305	0.012429		
Total	125	4.598			
CV= 17.05 %					

Cuadro 6A. Prueba de Shapiro-Wilk ensayo *in vitro* concentración 50 mM NaCl

p-valor:	2.72x10 ⁻¹²
Atención:	a 5% de significancia, los residuos no pueden considerarse normales

Cuadro 7A. Prueba de Scott-Knott ensayo *in vitro* concentración 50 mM NaCl

Grupos	Cepas	Medias
a	TRI 001	1.05
b	Cg 14-02	0.87
b	Cg 14-05	0.85
c	Cg 14-20	0.78
c	Cg 14-03	0.75
c	Cg 14-12	0.74
c	Cg 14-09	0.74
c	Cg 14-15	0.67
c	Cg 14-17	0.67
c	Cg 14-19	0.67
c	Cg 14-06	0.67
c	Cg 14-01	0.66
c	Cg 14-16	0.63
d	TRI 002	0.62
d	Cg 14-10	0.60
d	Cg 14-18	0.58
d	Cg 14-04	0.53
d	Cg 14-13	0.52
e	Cg 14-14	0.41
e	Cg 14-07	0.41
e	Cg 14-08	0.33

1.3 75 mM NaCl

Cuadro 8A. Análisis de varianza ensayo *in vitro* concentración 75 mM NaCl

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	1.06038	0.053019	35.297	1.36x10 ⁻³⁷
Residuo	105	0.15772	0.001502		
Total	125	1.21809			
CV= 9.31 %					

Cuadro 9A. Prueba de Shapiro-Wilk ensayo *in vitro* concentración 75 mM NaCl

p-valor:	4.97x10 ⁻⁰⁶
Atención:	a 5% de significancia, los residuos no pueden considerarse normales

Cuadro 10A. Prueba de Scott-Knott ensayo *in vitro* concentración 75 mM NaCl

Grupos	Cepas	Medias
a	Cg 14-20	0.58
a	TRI 002	0.55
b	Cg 14-03	0.51
b	Cg 14-12	0.51
c	Cg 14-02	0.48
c	Cg 14-10	0.47
c	Cg 14-13	0.47
c	Cg 14-14	0.47
c	Cg 14-06	0.45
c	Cg 14-09	0.45
d	TRI 001	0.44
d	Cg 14-19	0.42
d	Cg 14-01	0.42
e	Cg 14-05	0.39
e	Cg 14-15	0.37
e	Cg 14-18	0.36
e	Cg 14-16	0.35
f	Cg 14-04	0.31
f	Cg 14-17	0.29
g	Cg 14-07	0.26
g	Cg 14-08	0.23

1.41 mM NaCl**Cuadro 11A.** Análisis de varianza ensayo *in vitro* concentración 1 mM NaCl

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	20	3.1547	0.157737	145.97	3.29x10 ⁻⁶⁷
Residuo	105	0.1135	0.001081		
Total	125	3.2682			
CV= 12 %					

Cuadro 12A. Prueba de Shapiro-Wilk ensayo *in vitro* concentración 1 mM NaCl

p-valor:	3.83x10 ⁻⁰⁸
Atención:	a 5% de significancia, los residuos no pueden considerarse normales

Cuadro 13A. Prueba de Scott-Knott ensayo *in vitro* concentración 1 mM NaCl

Grupos	Cepas	Medias
a	Cg 14-01	0.91
b	Cg14-20	0.36
b	Cg 14-03	0.35
b	Cg 14-02	0.33
c	Cg 14-12	0.30
c	Cg 14-13	0.29
c	Cg 14-14	0.28
c	Cg 14-17	0.27
c	Cg 14-06	0.27
c	Cg 14-10	0.27
d	Cg 14-05	0.25
d	Cg 14-09	0.25
d	Cg 14-16	0.24
e	Cg 14-15	0.21
e	Cg 14-19	0.21
e	TRI 002	0.21
e	TRI 002	0.20
f	Cg 14-04	0.18
f	Cg 14-18	0.17
g	Cg 14-08	0.11
g	Cg 14-07	0.10

2. Ensayo *in vivo*

2.1 Longitud de tallo de caña de azúcar

Cuadro 14A. Análisis de varianza de longitud de tallo de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	3.1634	0.63267	1.26508	3.50x10 ⁻⁰¹
Bloque	2	0.8169	0.40844	0.81671	4.69x10 ⁻⁰¹
Residuo	10	5.0011	0.50011		
Total	17	8.9813			
CV= 5.38 %					

Cuadro 15A. Prueba de Shapiro-Wilk de longitud de tallo de caña de azúcar

p-valor:	6.02x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

De acuerdo con la prueba de F, las medias no pueden ser consideradas diferentes.

Niveles	Medias
Cg 14-01	12.71
Cg 14-02	12.53
Cg 14-03	13.07
Cg 14-20	13.33
Testigo absoluto	13.73
Testigo relativo	13.47

2.2 Longitud de raíz de caña de azúcar

Cuadro 16A. Análisis de varianza de longitud de raíz de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	128.11	25.622	2.9372	6.92x10 ⁻⁰²
Bloque	2	240.97	120.483	13.8115	1.33x10 ⁻⁰³
Residuo	10	87.23	8.723		
Total	17	456.31			
CV= 7.91 %					

Cuadro 17A. Prueba de Shapiro-Wilk de longitud de raíz de caña de azúcar

p-valor:	1.13x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

De acuerdo con la prueba de F, las medias no pueden ser consideradas diferentes.

Niveles	Medias
Cg 14-01	38.35
Cg 14-02	36.53
Cg 14-03	33.76
Cg 14-20	38.63
Testigo absoluto	41.90
Testigo relativo	34.93

2.2 Peso húmedo de tallo y hojas de caña de azúcar**Cuadro 18A.** Análisis de varianza de peso húmedo de tallo y hojas de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	1.9654	0.39307	0.5656	5.36x10 ⁻⁰¹
Bloque	2	0.4117	0.20584	0.45328	6.48x10 ⁻⁰¹
Residuo	10	4.5411	0.45411		
Total	17	6.9181			
CV= 9.75 %					

Cuadro 19A. Prueba de Shapiro-Wilk de peso húmedo de tallo y hojas de caña de azúcar

p-valor:	5.14x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

De acuerdo con la prueba de F, las medias no pueden ser considerados diferentes.

Niveles	Medias
Cg 14-01	6.86
Cg 14-02	6.97
Cg 14-03	7.20
Cg 14-20	7.23
Testigo absoluto	6.23
Testigo relativo	6.97

2.3 Peso húmedo de raíz de caña de azúcar

Cuadro 20A. Análisis de varianza de peso húmedo de raíz de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	51.711	10.3422	1.3453	3.22x10 ⁻⁰¹
Bloque	2	17.698	8.8491	1.1511	3.55x10 ⁻⁰¹
Residuo	10	76.875	7.6875		
Total	17	146.284			
CV= 12.95 %					

Cuadro 21A. Prueba de Shapiro-Wilk de peso húmedo de raíz de caña de azúcar

p-valor:	8.07x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

De acuerdo con la prueba de F, las medias no pueden ser considerados diferentes.

Niveles	Medias
Cg 14-01	19.32
Cg 14-02	21.57
Cg 14-03	20.10
Cg 14-20	23.57
Testigo absoluto	23.67
Testigo relativo	20.23

2.4 Peso seco tallo y hojas de caña de azúcar

Cuadro 22A. Análisis de varianza de peso seco de tallo y hojas de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	0.16025	0.03205	1.1426	3.99x10 ⁻⁰¹
Bloque	2	0.0049	0.00245	0.08734	9.17x10 ⁻⁰¹
Residuo	10	0.2805	0.02805		
Total	17	0.44505			
CV= 8.4 %					

Cuadro 23A. Prueba de Shapiro-Wilk de peso seco de tallo y hojas de caña de azúcar

p-valor:	3.93x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

De acuerdo con la prueba de F, las medias no pueden ser consideradas diferentes.

Niveles	Medias
Cg 14-01	1.87
Cg 14-02	1.87
Cg 14-03	2
Cg 14-20	2.07
Testigo absoluto	2.07
Testigo relativo	2.1

2.5 Peso seco de raíz de caña de azúcar

Cuadro 24A. Análisis de varianza de peso seco de raíz de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	2.07111	0.41422	4.3501	2.31x10 ⁻⁰²
Bloque	2	0.02778	0.01389	0.1459	8.66x10 ⁻⁰²
Residuo	10	0.95222	0.09522		
Total	17	3.05111			
CV= 11.34 %					

Cuadro 25A. Prueba de Shapiro-Wilk de peso seco de raíz de caña de azúcar

p-valor:	7.98x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

Cuadro 26A. Prueba Scott.Knott de peso seco de raíz de caña de azúcar

Grupos	Tratamientos	Medias
a	T4	3.23
a	T5	3.07
b	T2	2.73
b	T6	2.63
b	T1	2.33
b	T3	2.33

2.6 Peso seco de la planta de caña de azúcar

Cuadro 27A. Análisis de varianza de peso seco de la planta de caña de azúcar

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	5	2.966	0.59321	8.8885	1.91x10 ⁻⁰³
Bloque	2	0.032	0.01601	0.2398	7.91x10 ⁻⁰¹
Residuo	10	0.6674	0.06674		
Total	17	3.6654			
CV= 5.49 %					

Cuadro 28A. Prueba de Shapiro-Wilk de peso seco de la planta de caña de azúcar

p-valor:	4.0x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

Cuadro 29A. Prueba de Scott.Knott de peso seco de la planta de caña de azúcar

Grupos	Tratamientos	Medias
a	Cg 14-20	5.333333
a	Testigo absoluto	3.133333
b	Testigo relativo	4.666667
b	Cg 14-02	4.566667
b	Cg 14-03	4.333333
b	Cg 14-01	4.203333

Anexo 2. Evaluación de cuatro metodologías de dilución para el conteo de conidias en el Hematocímetro o cámara de Neubauer aplicado al hongo *Metarhizium anisoplae*.

1 Resumen

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena, La Democracia, Escuintla. Se evaluaron cuatro metodologías de dilución para el conteo de conidias en el Hematocímetro aplicado al hongo *Metarhizium anisoplae*. Las metodologías de dilución evaluadas fueron: Método del Laboratorio de Microorganismos del Ingenio Magdalena, método de Francisco Badilla F., método de CENGICAÑA por Werner Ovalle, método de EMBRAPA-medio ambiente. Para determinar la variabilidad, se realizó un Diseño completamente al azar, cuatro repeticiones por cada metodología y tres lecturas.

Para el conteo de conidias se utilizó un microscopio con el objetivo 40X ya que este es más preciso al momento de contar las conidias en la cámara de Neubauer. Se determinó estadísticamente que la mejor metodología para utilizar en el conteo de conidias es la del Dr. Francisco Badilla F. en la cual los datos fueron homogéneos, seguido la del laboratorio de microorganismos del Ingenio Magdalena.

2 Introducción

En algunas ocasiones, el ataque de insectos plagas constituye una de las causas de la baja producción y rendimiento de la caña de azúcar (Mendoza Mora, Mejía Moreira, & Gualle Alvarado, 2001).

Los hongos son organismos microscópicos que se encuentran en la naturaleza en el ambiente, rastros de cultivos, en el suelo, las plantas, etc; obtienen su nutrición de otros organismos o de materia orgánica, su cuerpo está constituido por una estructura llamada micelio, que es un conjunto de estructuras filamentosas llamadas hifas. Estos se

desarrollan bien en lugares frescos, húmedos y con poco sol. A los hongos que obtienen su nutrición a partir de insectos son conocidos como entomopatógenos, ya que causan enfermedades en los insectos hasta causar su muerte (Granda, Producción y uso de hongos entomopatógenos, 2003).

Un requisito esencial para la producción de cualquier agente de control biológico es un sistema de control de la calidad efectivo. La calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida (Fernández & Vega , Temas interesantes acerca del control biológico de plagas, 2006)

3 Marco conceptual

3.1 Metarhizium anisoplae

Este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Moniliaceae. Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son el salivazo de la caña de azúcar (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* sp), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Granda, Producción y uso de hongos entomopatógenos, 2003).

3.2 Producción de hongos entomopatógenos

El uso de los hongos entomopatógenos, para el control de plagas agrícolas, constituye una alternativa viable para los productores, ya que de ser eficiente en el control de las plagas, presenta muchos beneficios desde el punto de vista ambiental, agroecológico y de salud humana (Granda, Producción y uso de hongos entomopatógenos, 2003).

La producción de hongos entomopatógenos, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente (Granda, Producción y uso de hongos entomopatógenos, 2003).

3.3 Determinación de la concentración de conidios por gramo

El manejo de diferentes cepas de hongo ha generado resultados variables con respecto a cada lote producido. Las variaciones del sustrato, las diferencias de humedad y temperatura tanto internas del laboratorio como externas (propias del ambiente), la vigorosidad y agresividad de las cepas y su capacidad de desarrollo generan diferencias en las concentraciones de cada lote (Castro Alfaro, Control de calidad en los procesos de hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica, 2002).

La determinación de la concentración de conidios es una técnica cuantitativa con la cual se establece la cantidad de conidios del hongo entomopatógeno presente en la muestra. Los conteos de conidios se realizan en la cámara de Neubauer o hemocitómetro, utilizando el microscopio óptico con el objetivo 40x (Castro Alfaro, Control de calidad en los procesos de hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica, 2002).

El hematocímetro (cámara de Neubauer) es un instrumento ideado para contar células sanguíneas y se puede usar también para estimar la concentración de conidias en una suspensión acuosa de esporas (Bustillo Pardey, Cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos, 2010).

El hematocímetro es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm²

cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de las conidias. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda (Cañedo & Ames, Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos, 2004).

Esta metodología es aplicable a los productos con formulación de gránulos dispersables, polvo mojable y suspensión concentrada (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Brasil (EMBRAPA), 2014).

4. Objetivo

Determinar la variabilidad de 4 metodologías de dilución para el conteo de conidias aplicado al hongo *Metarhizium anisoplae*.

5. Materiales y métodos

Para determinar la variabilidad de las metodologías aplicadas, se realizó un Diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por cada metodología y se realizaron tres lecturas.

5.1 Metodología de CENGICAÑA por Werner Ovalle

La solución madre fue preparada con 1 g de hongo (*Metarhizium anisoplae* - lote 119) en 10 mL de agua desmineralizada con una gota de Tween 20 la cual fue agitada

vigorosamente por 2 minutos con la ayuda del vortex. Luego, la solución de 10 mL de conidias fue transferida a un Erlenmeyer conteniendo 490 mL de agua desmineralizada y se agregó a la solución Tween 20 al 0.1%. La solución madre se le colocó agitador magnético, colocado en una estufa agitadora por 5 minutos.

Las diluciones fueron preparadas en tubos de ensayo colocando una alícuota de 1 mL de solución madre y 9 ml de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1%, esto quiere decir que se obtuvo una dilución de 1:9, sólo se realizó una dilución, luego con una pipeta Pasteur se llenó la cámara de Neubauer y se colocó un cubreobjeto.

Se contaron las conidias presentes en los cuadrantes, en cada uno se contaron dos campos, con 4 cuadrantes, los dos cuadrantes superiores y dos inferiores, con un total de 8 cuadrantes.

5.2 Metodología de Francisco Badilla

La solución madre fue preparada en un Erlenmeyer de 250 mL colocando 10 g de hongo (*Metarhizium anisoplae* - lote 119), en 100 mL de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %. La solución madre se le colocó un agitador magnético, colocado en una estufa agitadora y agitando por 5 minutos.

Las diluciones fueron preparadas en tubos de ensayo colocando una alícuota de 1 mL de solución madre y 9 ml de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %, se realizó una segunda dilución de 1:9 extrayendo 1 mL de la primera dilución en 9 ml de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 % y una tercera dilución de 1:5 es decir, se colocó una alícuota de 1 mL de la segunda dilución de 1:9 en 4 mL de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %, luego con una pipeta Pasteur se llenó la cámara de Neubauer y se colocó un cubreobjeto.

Se realizó contando las conidias presentes en los cuadrantes, en este caso se contaron los cuatro campos que tiene la cámara de Neubauer, por lo que fue un total de 16 cuadrantes leídos.

5.3 Metodología de EMBRAPA-Medio Ambiente

La solución madre fue preparada en un Erlenmeyer de 1000 mL colocando 10 g de hongo (*Metarhizium anisoplae* - lote 119), en 500 mL de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %. La solución madre se le colocó un agitador magnético, colocado en una estufa agitadora por 5 minutos.

Las diluciones fueron preparadas en tubos de ensayo colocando una alícuota de 1 mL de solución madre y 9 ml de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %., se realizó otra dilución de 1:9 extrayendo 1 mL de la primera dilución en 9 ml de agua desmineralizada con Tween 20 al 0.1 %. Con una pipeta Pasteur se llenó la cámara de Neubauer y se colocó un cubreobjeto.

Se contaron las conidias presentes en los cuatro campos, pero en este caso sólo se contaron los cuadrantes que se encontraban en medio del campo de la cámara de Neubauer por lo que fue un total de 4 cuadrantes leídos.

6. Análisis estadístico

Los datos de las metodologías se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey ($P=0.05$) en la que se obtuvo el mejor resultado para el conteo de conidias. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R (R Core Team, 2013).

7. Resultados

Para realizar las cuatro metodologías de dilución se realizaron tres lecturas, en la cual, en cada lectura tuvo su propia solución madre, esto se realizó para saber la variabilidad de concentraciones de cada lectura.

La lectura 1 obtuvo diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 3.7327×10^{-06}), la Metodología Francisco Badilla presentó la mayor media de 6.2×10^9 conidias/mL (Figura 1). La lectura 2 obtuvo diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 3.8942×10^{-05}), la Metodología Francisco Badilla fue la mejor en esta lectura ya que posee una media de 4.805×10^9 conidias/mL seguido de la metodología de Ovalle-CENGICAÑA, que posee una media de 4.07×10^9 conidias/mL (Figura 1).

La lectura 3 obtuvo diferencia significativa entre tratamientos (p -value: 0.037143), la Metodología del Laboratorio de Microorganismos presentó los mayores valores en esta lectura, con una media de 6.6175×10^9 conidias/mL, seguido de la metodología de Ovalle-CENGICAÑA, que posee una media de 5.1125×10^9 conidias/mL y la Metodología Francisco Badilla que posee una media de 4.7925×10^9 conidias/mL (Figura 2).

Lo anterior nos indica que el conteo de conidias difiere estadísticamente de acuerdo a la metodología utilizada.

Al observar las diferentes gráficas de las diferentes lecturas, se observó que la metodología de dilución del Francisco Badilla reporta la más alta (Figura 2), pero la metodología que tiene una mayor estabilidad en la concentración es la Metodología EMBRAPA-Medio Ambiente (Figura 1).

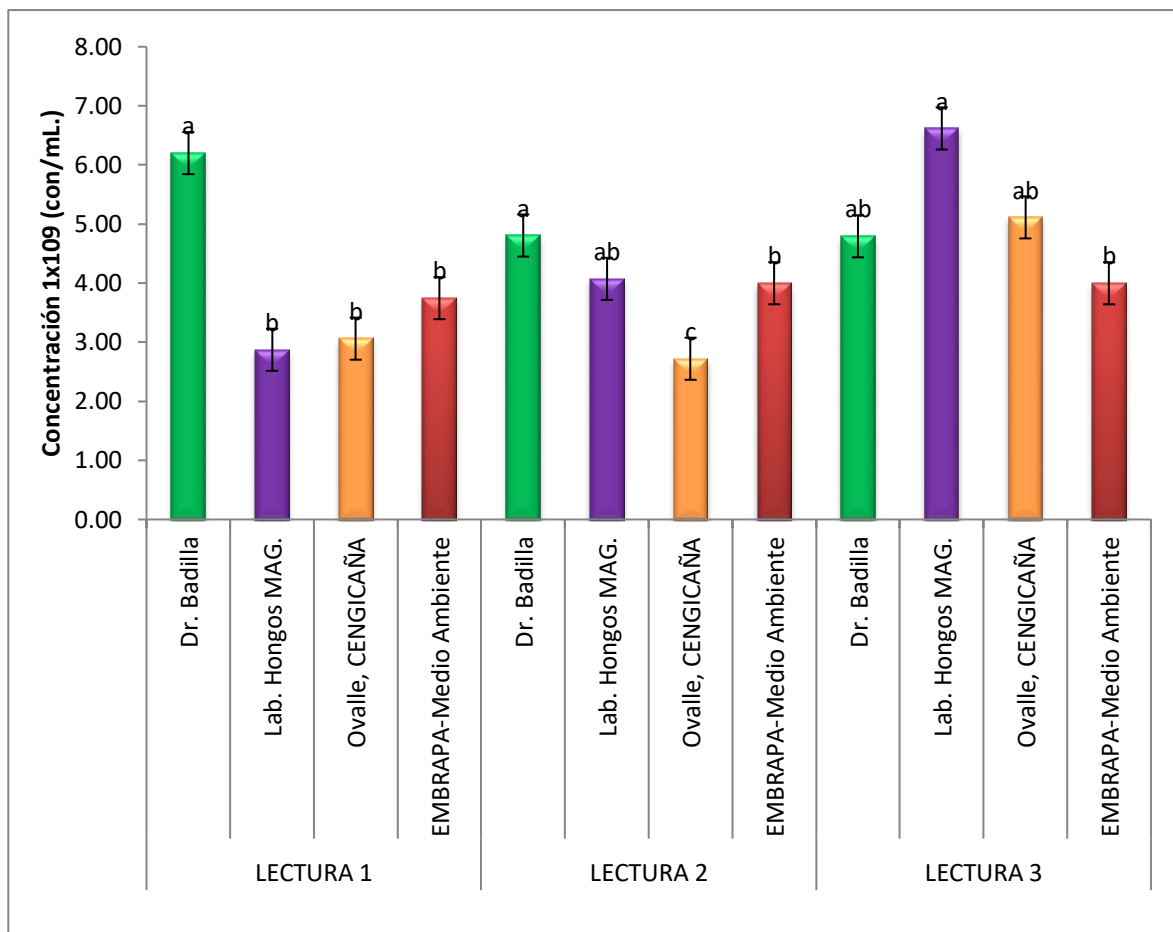


Figura 1. Gráfica de concentración de las diferentes Metodologías de dilución por lectura.

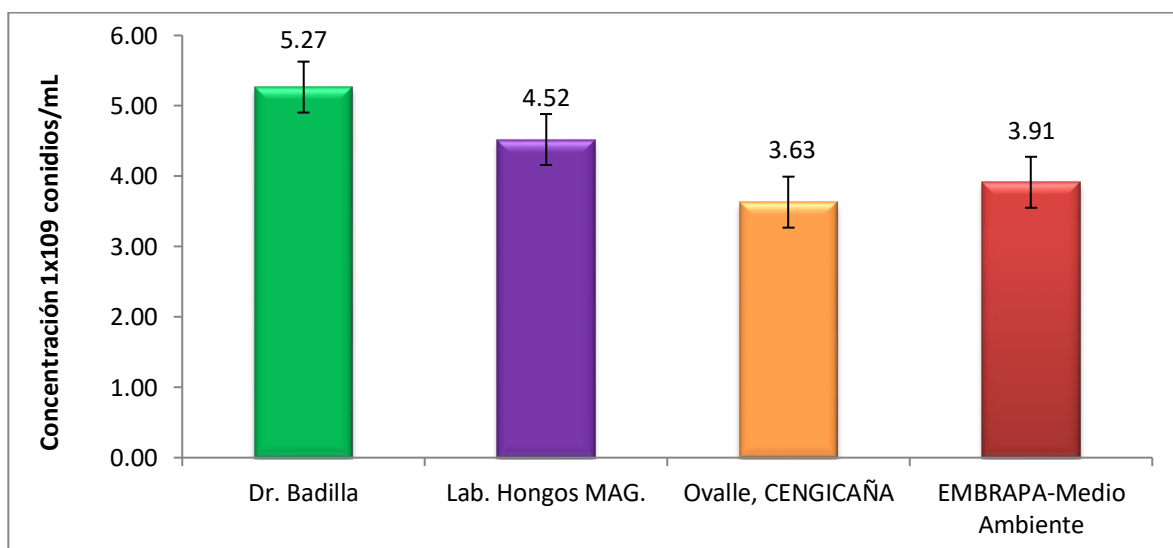


Figura 2. Gráfica de concentración de las diferentes Metodologías de dilución.

8. Conclusiones

1. La metodología EMBRAPA-Medio Ambiente fue la que fue más estable al momento de realizar el conteo de conidias en la cámara de Neubauer.

9. Bibliografía

1. Bustillo Pardey, A. E. (2010). *Cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos*. Colombia: Universidad Nacional-PALMIRA.
2. Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima. Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
3. Castro Alfaro, L. M. (2002). *Control de calidad en los procesos de hongos entomopatógenos y del parasitoide Cotesia flavipes en Costa Rica*. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica.
4. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Brasil (EMBRAPA). (2014). *Evaluación de calidad de productos a base de Trichoderma*. Brasil: EMBRAPA.
5. Fernández, O., & Vega, I. (2006). *Temas interesantes acerca del control biológico de plagas* (2 ed.). La Habana, Cuba, Venezuela: Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
6. Granda, D. (2003). *Producción y uso de hongos entomopatógenos*. Universidad nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Nicaragua: Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Agrícola y Forestal.
7. Mendoza Mora, J., Mejía Moreira, K., & Gualle Alvarado, D. (2001). *El salivazo de la caña de azúcar (Mahanarva andigena)*. Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE) / Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios.
8. R Core Team. (2013). *R: Language and environment for statistical computing*. USA: R Foundation for Statistical Computing.

4 Anexos

1. Lectura 1

Cuadro 3B. Análisis de varianza de la lectura 1

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	3	28.2245	9.4082	34.123	3.73x10 ⁻⁰⁶
Residuo	12	3.3086	0.2757		
Total	15	31.5331			
CV= 13.23 %					

Cuadro 4B. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk de la lectura 1

p-valor:	8.32x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

Cuadro 5B. Prueba de Tuckey de la lectura 1

Grupos	Tratamientos	Medias
a	T1	6.2
b	T4	3.745
b	T3	3.06
b	T2	2.8725

2. Lectura 2

Cuadro 6B. Análisis de varianza de la lectura 2

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	3	9.0027	3.00091	21.685	3.89E-05
Residuo	12	1.6607	0.13839		
Total	15	10.6634			
CV= 9.54 %					

Cuadro 7B. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk de la lectura 2

p-valor:	1.75x10 ⁻⁰¹
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

Cuadro 8B. Prueba de Tuckey de la lectura 2

Grupos	Tratamientos	Medias
a	T1	4.81
ab	T2	4.07
b	T4	4.00
c	T3	2.72

3. Lectura 3**Cuadro 9B.** Análisis de varianza de la lectura 3

Cuadro de Análisis de varianza					
	GL	SC	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	3	14.438	4.8126	3.8992	3.71x10 ⁻⁰²
Residuo	12	14.811	1.2342		
Total	15	29.249			
CV= 21.66 %					

Cuadro 10B. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk de la lectura 3

p-valor:	8.17x10 ⁻⁰³
De acuerdo con esta prueba de Shapiro-Wilk a un 5 % de significancia, los residuos pueden ser considerados normales	

Cuadro 11B. Prueba de Tuckey de la lectura 3

Grupos	Tratamientos	Medias
a	T2	6.6175
ab	T3	5.1125
ab	T1	4.7925
B	T4	3.9975

Anexo 3. Evaluación de la mortandad y parasitismo inducida por *Beauveria bassiana* con diferentes aplicaciones al barrenador del tallo en caña de azúcar (*Diatraea sp.*).

1 Resumen

El presente estudio se realizó en la Finca San Patricio en el Laboratorio de microorganismos del ingenio Magdalena. Se evaluó la mortandad y parasitismo inducida por *Beauveria bassiana* con diferentes aplicaciones al barrenador del tallo en la caña de azúcar (*Diadotrea sp.*).

Se realizaron 5 tratamientos y 9 repeticiones, utilizando las cepas I.L.U. de *Beauveria bassiana* proveniente del Ingenio La Unión y Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) como insecticidas biológicos. Se aplicó la misma dosis al momento de la inoculación, esto para observar el efecto que tiene en el barrenador de la caña de azúcar y cuál de los dos es más eficiente en la mortandad y parasitismo.

El tallo de caña de azúcar sumergido en Dipel WG obtuvo 100 % de mortalidad de las larvas, seguido del tallo de caña de azúcar barrenado por *Diadotrea sp.* con un 92 %. Con respecto al parasitismo Dipel WG no obtuvo larvas parasitadas, sin embargo *Beauveria bassiana* si obtuvo larvas parasitadas.

2 Introducción

La región cañera de Guatemala está localizada en la planicie costera del océano Pacífico en las regiones fisiográficas de la Llanura costera del Pacífico y Pendiente volcánica reciente (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, Guatemala (Cengicaña), 2007).

Diadotrea sp. (Lepidoptera: Crambidae) pertenece al grupo de los insectos conocidos como barrenadores de la caña de azúcar y es una de las plagas de mayor importancia económica en este cultivo, el cual puede causar pérdidas de 0.36 kg azúcar por tonelada de caña con un 1 % de intensidad de infestación (Marquez, Manejo integrado de plagas, 2012).

El barrenador de la caña de azúcar se caracteriza por causar perforaciones en el tallo durante su fase larval, luego pasar al estadio de crisálida para posteriormente a adulto y con ello la ovoposición de donde emergerá la siguiente generación y aumentar el daño en cuanto a cantidad de tallos y entrenudos perforados (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, Guatemala (Cengicaña), 2007).

3 Marco conceptual

3.1 Barrenador del tallo en la caña de azúcar del género *Diatraea*

Las especies del género *Diatraea* (Lepidoptera: Pyralidae) son las de mayor importancia económica y mayor distribución geográfica en Guatemala (Marquez, Manejo integrado de plagas, 2012).

La biología de las especies de *Diatraea* indica que ambas colocan huevos agregados en posturas y requieren entre 5 y 6 días para eclosionar. El período de desarrollo larval es significativamente diferente, ya que en *D. saccharalis* es de 21 a 23 días, en tanto que en *D. nr. crambidoides* se prolonga de 33 a 43 días (Marquez, Manejo integrado de plagas, 2012).

Las larvas de *D. saccharalis* presentan el tubérculo mesotorácico dorsal alargado transversalmente y redondeado en la parte anterior, mientras que *D. nr. crambidoides* tiene el tubérculo mesotorácico dorsal en forma de “B” alargada, con una incisión media anterior. El período de pupa requiere de 8 a 10 días, luego emergen los adultos, que viven

de 3 a 4 días en promedio. Rara vez se ven los adultos en el campo, ya que son de hábitos nocturnos y voladores de poco alcance, atraídos por las luces artificiales nocturnas (Marquez, Manejo integrado de plagas, 2012).

3.2 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo imperfecto de la clase Deuteromycetes, capaz de infectar a más de 200 especies de insectos. Es de apariencia polvorosa, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso. El ciclo de vida de este hongo consta de dos fases: la patogénica y la saprofitica. El desarrollo del hongo se puede dividir en ocho etapas las cuales son:

1. **Adhesión:** El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora (conidio) es depositada en la superficie del insecto
2. **Germinación:** El conidio inicia el desarrollo de su tubo germinativo y un órgano sujetador (llamado apresorio), que le permite fijarse a la superficie del insecto. Para una germinación adecuada se requiere una humedad relativa del 92 % y temperatura de entre 23 a 25 °C
3. **Penetración:** Después de la fijación mediante mecanismos físicos (acción de presión sobre la superficie de contacto) y químicos (acción de enzimas: proteasas, lipasas y quitinasas), el hongo ingresa en el insecto a través de las partes blandas.
4. **Producción de toxinas:** Dentro del insecto, el hongo ramifica sus estructuras y coloniza las cavidades del hospedante. Produce la toxina llamada Beauverecina que ayuda a romper el sistema inmunológico del patógeno, lo que facilita la invasión

del hongo a todos los tejidos. Otras toxinas que secreta son beauvericin, beauverolides, bassianolide, isarolides, ácido oxálico, y los pigmentos tenellina y bassianina a las estructuras invasivas del hongo.

5. **Muerte del insecto:** Muerte del patógeno y marca fin de la fase parasítica, dando así inicio a la fase saprofitica.

6. **Multiplicación y crecimiento:** Después de la muerte del insecto, el hongo multiplica sus unidades infectivas (hifas) y estas de manera simultánea crecen, terminando por invadir todos los tejidos del insecto y haciéndose resistente a la descomposición, aparentemente por los antibióticos segregado por el hongo. Después de la completa invasión, el desarrollo posterior del hongo sobre el insecto depende de la humedad relativa, y en caso de no contar con las condiciones idóneas el insecto permanece con apariencia de momia.

7. **Penetración del inferior hacia el exterior:** Solo si las condiciones ambientales lo permiten el hongo penetra las partes blandas del insecto y emerge hacia el exterior.

8. **Producción de nuevas unidades reproductivas:** Al contar las condiciones para su desarrollo inicia la producción de nuevas unidades reproductivas o conidios.

4 Objetivos

Evaluar la mortandad y parasitismo del barrenador del tallo de la caña de azúcar (*Diadotrea* sp.) inducida por *Beauveria bassiana*.

5 Materiales y métodos

5.1 Ensayo *in vivo*

5.2 Caña de azúcar

La caña utilizada fue de tipo estolón de 10 cm, colocándose en frascos de 30 cm con tapadera. El ensayo se realizó en una sala del Laboratorio de Microorganismos. Se realizaron 5 tratamientos, en la que cada uno tenía 19 repeticiones (19 frascos).

Se utilizó la cepa I.L.U de *Beauveria bassiana* proveniente del Ingenio La Unión, obtenida del Laboratorio de Microorganismos Ingenio Magdalena S.A., La Democracia, Escuintla, Guatemala, C.A.

Se utilizó 250 mL de la cepa I.L.U a una concentración de 1.50×10^9 conidias/mL, luego se aforó a 750 mL de agua destilada para obtener una concentración de 1×10^9 conidias/mL.

La aplicación de los microorganismos al ensayo se realizó de la siguiente manera:

- **Tratamiento 1:** Se le asperjó de *Beauveria bassiana* a una concentración de 1×10^9 , teniendo el estolón de caña de azúcar barrenado por *Diadettrea* sp.
- **Tratamiento 2:** Se asperjó de Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) a una concentración de 1×10^9 , teniendo el estolón de caña de azúcar barrenado por *Diadettrea* sp.
- **Tratamiento 3:** Se sumergió completamente el estolón de caña de azúcar en solución de *Beauveria bassiana* a una concentración de 1×10^9 conidias/mL y luego se agregó el barrenador del tallo de la caña de azúcar (*Diadettrea* sp.).

- **Tratamiento 4:** Se sumergió completamente el estolón de caña de azúcar en solución de Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) y luego se le agregó el barrenador del tallo de la caña de azúcar (*Diadotrea* sp.).
- **Testigo:** No se le aplicó nada, teniendo el estolón de la caña de azúcar barrenado por *Diadotrea* sp.

Luego de la aplicación de los microorganismos se dejó por 4 días para observar cómo fue el modo de acción.

Al haber transcurrido los 4 días de aplicación, se procedió a finalizar el ensayo, esto consistió en sacar los barrenadores de los estolones de caña de azúcar y colocar cada uno en cajas petri, se midió cada uno de los estolones para saber cuánto fue lo que recorrió el barrenador, esto para observar si hubo alguna reacción al aplicar el microorganismo.

Se trasladaron los barrenadores a la cámara de flujo laminar y se procedió a desinfestarlas (tren de desinfestación), esto se realizó para saber si el barrenador fue parasitado por *Beauveria bassiana* y si provocó la muerte del barrenador.

Cada barrenador se colocó en una cámara húmeda diferente. Para realizar la cámara húmeda se utiliza caja petri de vidrio, colocando dentro de ésta una rueda de papel filtro y sobre él se le coloca un portaobjeto, todos estos utensilios previamente estériles, luego se agrega el barrenador sobre el portaobjeto y se humedece el papel filtro con agua destilada, se tapa y se sella con parafilm.

Al momento de levantar el ensayo se tomó por repetición si la larva está viva o muerta y el recorrido de la larva al momento de barrenar el estolón de caña de azúcar.

A las 24 hrs siguientes de estar los barrenadores en los estolones de caña de azúcar, se contaron los larva parasitadas, larvas no parasitadas, indicando si están muertas o vivas.

Utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2013), los datos, mortalidad de larvas se sometieron a la prueba de normalidad y análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Scott-Knott ($P=0.05$).

6 Resultados y discusión

Para obtener la mortalidad de larvas se utilizó la fórmula Abbott's y se obtuvo lo siguiente: *Beauveria bassiana* asperjado al tallo de caña de azúcar barrenado por *Diadetea* sp presentó una mortalidad del 51 % de larvas, Dipel WG (*Bacillus thurigiensis*) asperjado al tallo de caña de azúcar barrenado por *Diadetea* sp. presentó una mortalidad del 92.3 %, el tallo de caña de azúcar sumergido en *Beauveria bassiana* presentó 45.2 % de mortalidad y por último el tallo de caña de azúcar sumergido en Dipel WG (*Bacillus thurigiensis*) obtuvo una mortalidad del 100 % de las larvas (Figura 1).

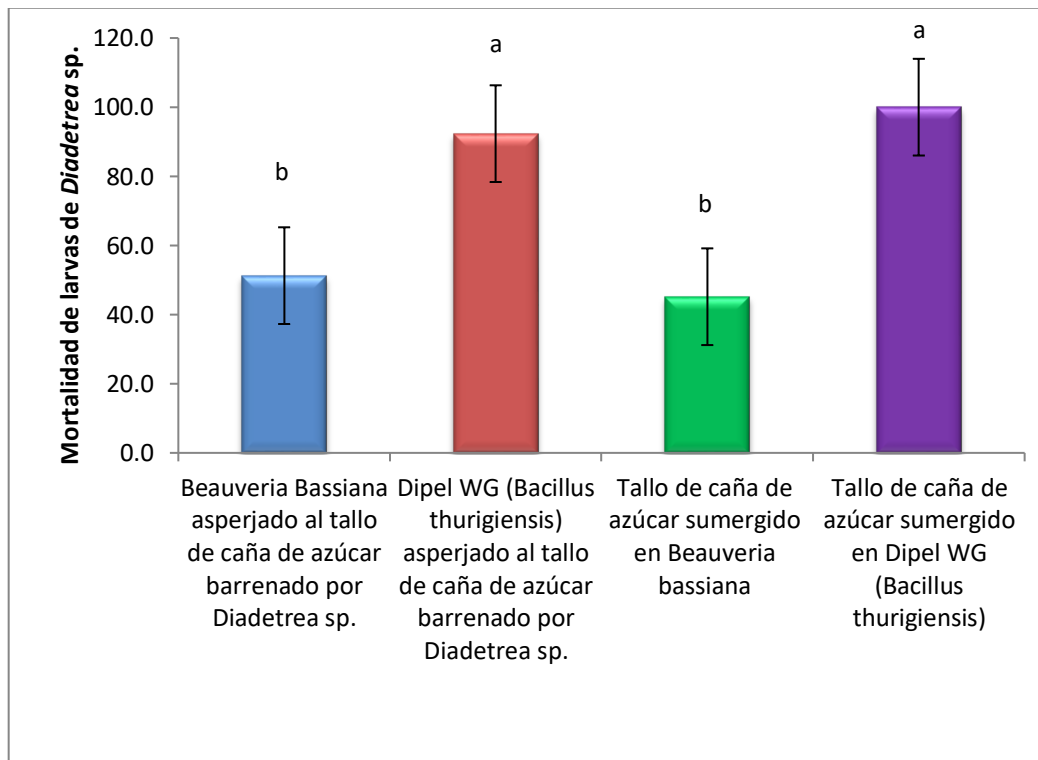


Figura 1. Gráfica de mortalidad de larvas de *Diadetea* sp.

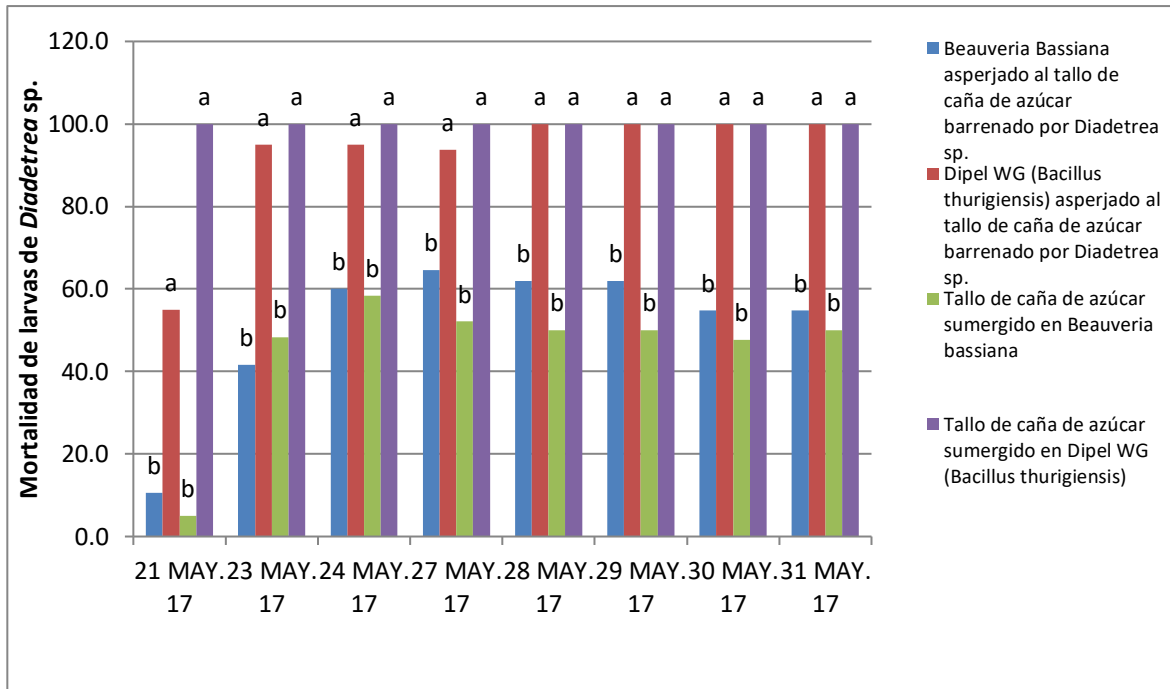


Figura 2. Gráfica del comportamiento de la mortalidad de larvas de *Diadetea* sp. conforme al tiempo

Para obtener el parasitismo de las larvas de *Diadetea* sp. se utilizó la ecuación:

$$\text{Parasitismo de larvas} = \left(\frac{\Sigma \text{larvas parasitadas}}{\Sigma \text{larvas muertas} + \Sigma \text{larvas parasitadas}} \right) \times 100$$

Al realizar la ecuación se obtuvieron los siguientes resultados:

- *Beauveria Bassiana* asperjado al tallo de caña de azúcar barrenado por *Diadetea* sp. presentó un 17.8 % de parasitismo.
- Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) asperjado al tallo de caña de azúcar barrenado por *Diadetea* sp. no presentó larvas parasitadas ya que éste mató a toda la población.
- Tallo de caña de azúcar sumergido en *Beauveria bassiana* presentó un 27 % de larvas parasitadas.

- Tallo de caña de azúcar sumergido en Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) no presentó larvas parasitadas ya que éste mató a toda la población (Figura 3).

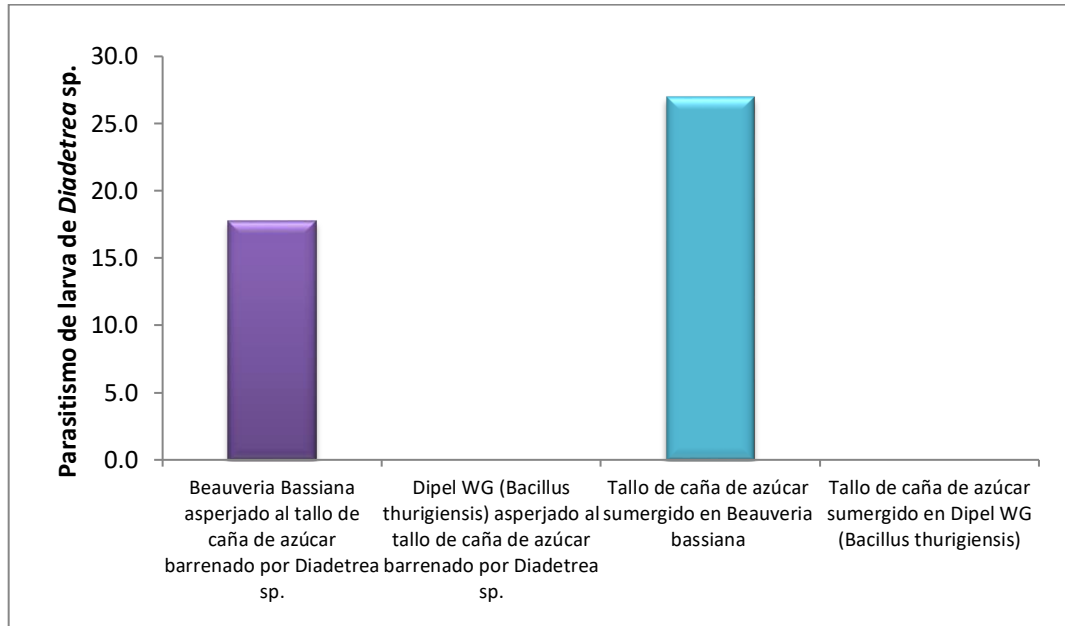


Figura 3. Gráfica parasitismo del barrenador de la caña de azúcar (*Diadetrea* sp.)

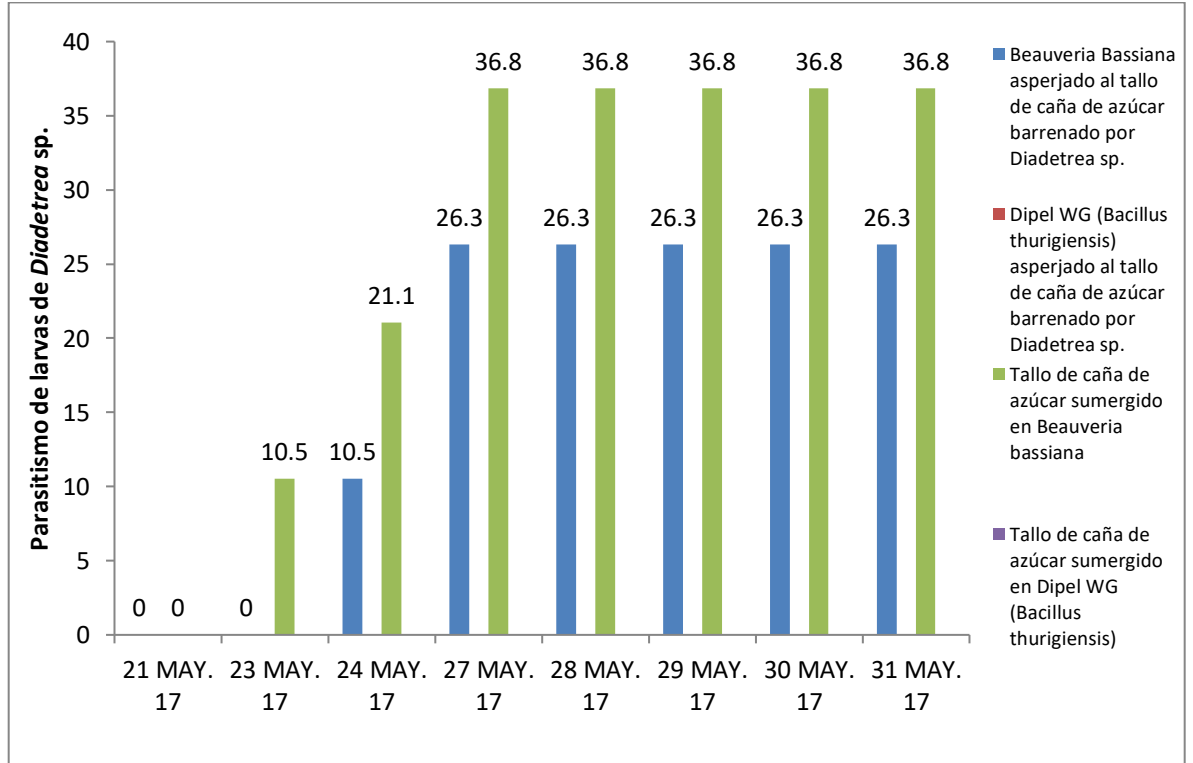


Figura 4. Gráfica del comportamiento de parasitismo del barrenador de la caña de azúcar (*Diadetrea* sp.) conforme al tiempo.

7 Conclusiones

1. La aplicación de *Beauveria bassiana* induce el parasitismo de la larva barrenador en la caña de azúcar y el Dipel WG (*Bacillus thuringiensis*) produce la mayor mortalidad de las larvas.
2. *Beauveria bassiana* aplicado con atomizador al tallo de la caña de azúcar originó una mortalidad de 51.3 % de larvas en cambio al sumergir el tallo de caña de azúcar en *Beauveria bassiana* produjo un 45.2 % de mortalidad.
3. El tallo sumergido en *Beauveria bassiana* obtuvo un 27 % de parasitismo y *Beauveria bassiana* asperjado al tallo de caña de azúcar obtuvo un 17% de parasitismo.

8 Bibliografía

- 1 Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, Guatemala (Cengicaña). (2007). *Evolución de la producción y productividad de la agroindustria azucarera y mapas generales de la zona cañera de la costa sur de la república de Guatemala*. Guatemala: CENGICAÑA.
- 2 Marquez, J. M. (2012). Manejo integrado de plagas. En M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, & R. Espinosa, *El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala* (págs. 203-232). Guatemala: Aratemis Edinter.
- 3 R Core Team. (2013). *R: Language and environment for stistical computing*. USA: R Foundation for Statistical Computing.