

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA



TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA (BIOMag), DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

JORGE LUIS SANDOVAL AGUIRRE  
201015227

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE  
BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA (BIOMag), DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y  
DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA,  
ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

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

POR

**JORGE LUIS SANDOVAL AGUIRRE**

201015227

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO  
INGENIERO AGRÓNOMO  
EN  
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA



**RECTOR**

Dr. Carlos Guillermo Alvarado Cerezo

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL PRIMERO	Dr. Tomas Antonio Padilla Cámara
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. M. Sc. César Linneo García Contreras
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. M. Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL CUARTO	P. Agr. Josué Benjamín Boche López
VOCAL QUINTO	M. Eh. Rut Raquel Curruchich Cumez
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2015



Guatemala, Noviembre de 2015

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 realizado en el Departamento de Biotecnología Magdalena (BIOMag), División de Investigación y Desarrollo Agrícola, INGENIO MAGDALENA S. A., La Democracia, Escuintla, Guatemala, C.A, como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

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

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

JORGE LUIS SANDOVAL AGUIRRE

201015227



## **ACTO QUE DEDICO**

**A:**

- DIOS** Por darme la vida, La bendición y las oportunidades en la vida que me han permitido llegar hasta este gran logro.
- MI MAMA** Alma Janete Aguirre Rivera por todo tu apoyo, amor, comprensión en este largo trayecto de la vida, ser mi ejemplo en la vida, ayudarme a ser quien soy y por esta meta, gracias te amo.
- MI PAPA** Jorge Ovidio Sandoval Ventura por todo tu apoyo, amor, comprensión y consejos que ha labrado mi vida y mi camino para este gran logro, gracias te amo.
- MIS HERMANOS** Alma Magaly Sandoval Aguirre y Carlos Eduardo Sandoval Aguirre por su apoyo y preocupación hacia mi persona en todo este tiempo, los quiero.
- MIS ABUELOS** María Amparo Rivera Linares, Luis Arturo Aguirre Ruano y Maria Leandra Sandoval Ventura (**q.e.p.d**) por su oraciones en todo momento y apoyo moral.
- FAMILIA EN GENERAL** Tíos, Primos y Sobrinos por su presencia en este acto y apoyo hacia mi persona en momentos de dicha y adversidad.



## TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

**A:**

**GUATEMALA**

Mi patria, país de la eterna primavera.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS  
DE GUATEMALA**

Alma mater, fuente de sabiduría.

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Por formarme como profesional y brindarme herramientas para este gran logro.

**ESCUELA NACIONAL CENTRAL  
DE AGRICULTURA**

Por darme las herramientas y el carácter necesario para afrontar las adversidades de la vida profesional.



## AGRADECIMIENTOS

**A:**

**Lic. Mamerto Reyes** por su valiosa asesoría, recomendación y colaboración en la elaboración del presente documento

**Ing. Agr. Manuel Martínez** por su valiosa asesoría y colaboración en la elaboración del presente documento.

**Dr. Adalberto Rodríguez** por su supervisión profesional y ejecución del presente trabajo de investigación.

**Ing. Agr. Luis Guevara** por su confianza y la oportunidad de realización de EPS.

**Ing. Agr. Estuardo López** por su confianza y asesoría en la realización de EPS.

Al personal del departamento de Biotecnología del Ingenio Magdalena, S.A., **Inga. Agra. Tracy Vela** y **P. Agr. Carlos Díaz** por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Personal del departamento de Biotecnología –BIOMag- que de una u otra forma colaboraron en la realización de la presente investigación y brindarme su confianza y cariño.

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







## ÍNDICE GENERAL

	página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
RESUMEN .....	1
CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO .....	3
1.1. Presentación .....	5
1.2. Marco Referencial .....	6
1.2.1. Descripción general del área .....	6
1.2.2. Instalaciones .....	7
1.2.3. Plagas más Importantes que afectan el cultivo de caña de azúcar en Guatemala: .....	10
1.2.4. Proceso de producción de organismos entomopatógenos .....	16
1.2.5. Bacillus thuringiensis: .....	18
1.2.6. Normas de higiene y Bioseguridad utilizadas .....	20
1.3. Objetivos .....	21
1.4. Metodología .....	22
1.5. Resultados .....	23
1.6. Conclusiones .....	25
1.7. Recomendaciones .....	26
1.8. Referencias .....	27
CAPÍTULO II: INVESTIGACIÓN EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE Trichoderma harzianum CEPA MAGDALENA, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A. ....	30
2.1. Presentación .....	32
2.2. Marco teórico .....	33
2.2.1. Marco conceptual .....	33
2.2.2. Marco referencial .....	44
2.3. Objetivos .....	51
2.4. Hipótesis .....	52

	página
2.5. Metodología .....	52
2.5.1. Descripción de la investigación .....	52
2.5.2. Variables respuesta.....	55
2.5.3. Manejo del experimento .....	56
2.5.4. Recolección de datos .....	64
2.6. Resultados .....	67
2.6.1. Concentración de conidios por gramo .....	67
2.6.2. Tasa de producción de conidios .....	69
2.6.3. Periodo para almacenamiento de sustratos .....	69
2.6.4. Viabilidad de conidios.....	70
2.7. Conclusiones.....	74
2.8. Recomendaciones .....	75
2.9. Referencias.....	76
2.10. Anexos .....	80
CAPÍTULO III: SERVICIOS .....	88
3.1. Presentación .....	90
3.2. Residualidad de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , con diferentes soluciones coadyuvantes para el control de gusano barrenador del tallo <i>Diatrea crambidoides</i> .....	91
3.2.1. Objetivos.....	91
3.2.2. Metodología.....	92
3.2.3. Manejo del Experimento.....	94
3.2.4. Resultados.....	99
3.3.5. Conclusiones .....	100
3.3.6. Recomendaciones.....	101
3.4. Evaluación del rendimiento de unidades formadoras de colonias –UFC- y calidad de antagonismo de diferentes cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> en el Departamento de Biotecnología, Ingenio Magdalena. ....	102

	página
3.4.1. Objetivos.....	102
3.4.2. Metodología.....	102
3.4.3. Manejo del Experimento.....	105
3.4.4. Resultados.....	114
3.4.5. Conclusiones .....	120
3.4.6. Recomendaciones.....	121
3.4.7. Referencias .....	122







## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación geográfica de la finca San Patricio, Municipio de La Democracia, Escuintla .....	6
Figura 2. Instalaciones del laboratorio de producción de organismos Entomopatógenos,.....	7
Figura 3. Área de aclimatación de plantas de caña de azúcar salidas de la biofábrica.....	8
Figura 4. Área de Cultivos varios del departamento de biotecnología -BIOMag-.....	9
Figura 5. Bodega del departamento de biotecnología -BIOMag- .....	9
Figura 6. Estado ninfal, ciclo del cultivo y adulto de chinche salivosa <i>Aenolamia</i> sp. ....	11
Figura 7. Larvas barrenadoras del tallo de caña de azúcar <i>Diatraea</i> sp.....	12
Figura 8: Proceso de infección utilizado por <i>Bacillus thuringiensis</i> en larvas del orden <i>Leptidoptera</i> .....	13
Figura 9. Estado adulto y estadios ninfales de saltón coludo <i>Saccharosydne saccharivora</i> .....	15
Figura 10. a) Adultos de roedores que afectan la caña de azúcar, b) Daño directo causado por el roedor en tallos de caña de azúcar .....	16
Figura 11. Producción de <i>Trichoderma harzianum</i> en instalaciones del laboratorio BIOMag.....	17
Figura 12. Estructuras físicas de bioseguridad, a. Rodiluvio, b. Pediluvio .....	20
Figura 13. Aislamiento de áreas de inoculación, laboratorio de producción de entomopatógenos .....	20
Figura 14. Formas de reproducción utilizadas por <i>Trichoderma</i> sp.....	40
Figura 15. Diagrama del Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> sp. ....	41
Figura 16. Unidad Experimental para cada sustrato evaluado .....	54
Figura 17. Distribución espacial de las unidades experimentales.....	54
Figura 18. Distribución espacial utilizada en la fase de bandeja para producción de estructuras reproductivas.....	55
Figura 19. Flujoograma de la obtención y conteo de concentración de matrices madre para inoculación.....	57
Figura 20. Fase de Remojo con sobrepeso para evitar flote y lavado de los sustratos evaluados .....	58
Figura 21. Proceso de cocción de los sustratos evaluados. ....	59
Figura 22. Fase de remoción de exceso de humedad, pesado y embolsado de los sustratos.....	60
Figura 23. Proceso de esterilización húmeda con autoclave. ....	61
Figura 24. Bolsas de celofán con sustrato solido salidas del proceso de esterilización húmeda .....	61
Figura 25. Equipo utilizado en la inoculación de <i>T. harzianum</i> , A. Inyector, B. Agitador magnético .....	62
Figura 26. Desarrollo del micelio de <i>Trichoderma</i> en los sustratos.....	62

	Página
Figura 27. Fase de desarrollo de estructuras reproductivas en bandeja de plástico.....	63
Figura 28. Fase de almacenamiento en las instalaciones del cuarto frio del ingenio Magdalena S.A.....	63
Figura 29. Flujo grama para el conteo de conidios por gramo.....	64
Figura 30. Unidades formadoras de colonias de Trichoderma sp. con Inicio de la fase de formación de micelio .....	66
Figura 31. Concentración media de conidios/g en los diferentes sustratos evaluados .....	67
Figura 32. Viabilidad de conidios de <i>T. harzianum</i> , en condiciones de refrigeración en los sustratos evaluados. ....	73
Figura 33. Viabilidad de conidios de <i>T. harzianum</i> en condiciones ambientales normales en los sustratos evaluados. ....	73
Figura 34A Balanza hidrométrica utilizada para la determinación del nivel de humedad de sustrato.....	85
Figura 35A. Áreas funcionales de importancia del departamento de biotecnología.....	86
Figura 36: Croquis de la distribución de las unidades experimentales aleatorizadas .....	93
Figura 37: Soluciones madre utilizadas para la aplicación posterior .....	95
Figura 38: Atomizador utilizado para la aplicación de los tratamientos.....	96
Figura 39: Lavado y desinfección de cajas petrí.....	96
Figura 40: Alimentación de la larva con hojas de caña de azúcar con los productos evaluados .....	97
Figura 41: Comparación de la condición de la larva de barrenador en la evaluación .....	98
Figura 42: Mortalidad de larvas de barrenador <i>Diatraea crambidoides</i> con diferentes productos y coadyuvantes.....	99
Figura 43: unidad experimental utilizada por cada cepa evaluada .....	104
Figura 44: Distribución de unidades experimentales en el laboratorio.....	104
Figura 45: Proceso de cocción del arroz.....	107
Figura 46: Fase de remoción de exceso de humedad, pesado y embolsado de los sustratos.....	108
Figura 47: Proceso de esterilización húmeda con Autoclave.....	108
Figura 48: Bolsas de celofán con sustrato salidas del proceso de desinfección en enfriamiento .....	109
Figura 49: inoculación de los sustratos con las solución de trichoderma.....	109
Figura 50: Fase de desarrollo de estructuras reproductivas en bandeja de plástico .....	110
Figura 51: Fase de almacenamiento en las instalaciones del cuarto frio del ingenio Magdalena S.A. ....	111
Figura 52: Flujo grama para el conteo de unidades formadoras de colonias/g.....	112
Figura 53: Diagrama de conteo de microorganismos con cámara de conteo de Neubauer .....	112
Figura 54: Concentración de UFC/g de 20 cepas de <i>T. harzianum</i> en 3 diferentes lotes de producción en almacenamiento .....	114

	Página
Figura 55: Prueba de control de calidad de Cultivos duales con interacción de T. harzianum contra Cephalosporium sacchari.....	117
Figura 56: Porcentaje de antagonismo de Trichoderma sp sobre Cephalosporium sacchari a las 96 horas .....	118
Figura 57: Prueba de control de calidad de placas sobrepuestas con interacción de Trichoderma sp. contra Cephalosporium sacchari sp. ....	119
Figura 58: Porcentaje de antagonismo de Trichoderma sp sobre Cephalosporium sacchari sp. por medio de la producción de metabolitos volátiles .....	119



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resumen histórico taxonómico del género <i>Trichoderma</i> spp .....	34
Cuadro 2. Contenido nutricional del grano de maíz .....	45
Cuadro 3. Composición aproximada del grano de arroz y fracciones .....	46
Cuadro 4. Análisis proximal promedio de las partes componentes del grano de sorgo .....	46
Cuadro 5. Análisis Proximal del olote de maíz <i>Zea mays</i> .....	47
Cuadro 6. Composición de la melaza de caña de azúcar .....	47
Cuadro 7. Tratamientos a evaluar en la investigación.....	53
Cuadro 8. Cantidad de sustrato utilizado por bolsa para Esterilización húmeda en autoclave.....	54
Cuadro 9. Tiempos de cocción utilizados para los diferentes sustratos evaluados	59
Cuadro 10. Tasa de crecimiento de concentración de conidios y coeficiente de determinación de modelos de regresión generado para cada sustrato.....	69
Cuadro 11. Porcentaje de humedad de los diferentes sustratos en diferentes días en bandeja .....	70
Cuadro 12. Valores de viabilidad de conidios para los diferentes sustratos en cosecha para almacenamiento.....	71
Cuadro 13. Tasa de Pérdida de viabilidad de <i>T. harzianum</i> cepa Magdalena .....	72
Cuadro 14A Productos comerciales a base de <i>Trichoderma</i> para control biológico de enfermedades en plantas .....	80
Cuadro 15 <sup>a</sup> Valores de producción de conidios en los diferentes sustratos evaluados, 10 días en bandeja .....	80
Cuadro 16A Resultados del análisis de varianza para la comparación del rendimiento de UFC/g entre sustratos.....	81
Cuadro 17A Resultados del análisis de comparación de medias con TUCKEY con 5% de significancia .....	81
Cuadro 18A Resultados del análisis de varianza para determinación del modelo de regresión del sustrato grano quebrado de maíz.....	81
Cuadro 19A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato grano de arroz .....	82
Cuadro 20A. Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato grano de sorgo .....	82
Cuadro 21A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato olote de maíz.....	83
Cuadro 22A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato olote de maíz con melaza.....	83

	Página
Cuadro 23A Viabilidad de esporas de <i>T. harzianum</i> en condiciones de refrigeración y en condiciones ambientales por 40 días.....	84
Cuadro 24A Análisis de varianza para el modelo de regresión de.....	84
Cuadro 25A Análisis de varianza para el modelo de regresión de viabilidad de conidios.....	85
Cuadro 26: Listado de Productos comerciales y coadyuvantes a utilizados .....	93
Cuadro 27: Productos comerciales y mezclas coadyuvantes evaluados .....	95
Cuadro 28: Porcentaje mortalidad media en función del tiempo con los diferentes tratamientos.....	99
Cuadro 29: Cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> evaluadas .....	103
Cuadro 30: Resultados del análisis de varianza para la variable rendimiento de Conidios de <i>Trichoderma</i> para las diferentes cepas. ....	116





TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA (BioMAG), DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

## RESUMEN

Con el fin de desarrollar y aplicar nuevas tecnologías, el Ingenio Magdalena S.A. cuenta con el Departamento de Biotecnología -BIOMag-, ubicado en la finca San Patricio, La Democracia, Escuintla, dicho departamento es el encargado de la investigación y producción masiva de microorganismos entomopatógenos y/o Fito antagonistas de interés comercial para el cultivo de caña de azúcar, en el presente trabajo se realizó el diagnóstico del estado actual del departamento con el fin de identificar problemáticas presentes, con lo que fueron propuestas investigaciones puntuales a fin de mitigar y/o resolver el problema de manera viable a corto y largo plazo.

Dentro de la problemática identificada se encuentran las instalaciones, ya que el área de investigación en microorganismos, presenta dificultad para cubrir el volumen de producción de organismos requerido por el ingenio y la correcta aplicación de normas de bioseguridad para evitar contaminación del sustrato de desarrollo utilizado, además la diversificación de programas de investigación en microorganismos es de reciente introducción, mientras que para el área de investigación en control de plagas no se cuenta con espacio físico designado para la colocación y manejo de investigaciones a nivel de laboratorio, con dicha problemática fueron propuestas medidas de mitigación a mediano plazo con el establecimiento de investigaciones detalladas en el presente documento.

Con el fin de reemplazar la aplicación de fungicidas químicos para el control de pudrición del esqueje de caña de azúcar causado por patógenos del suelo en la propagación asexual, es necesaria la introducción de organismos antagonistas como controladores biológicos, tal es el caso de *Trichoderma harzianum* de la cual se evaluó la productividad de la cepa Magdalena sobre diferentes sustratos sólidos: grano quebrado de maíz, grano de arroz, grano de sorgo, olote de maíz y olote de maíz + melaza (10%) en laboratorios de producción masiva con condiciones de humedad y temperatura (26 °C) constantes, en donde el sustrato grano de sorgo fue el mejor ya que presentó mayor rendimiento ( $1.3 \times 10^8$  conidios/g) con una tasa de crecimiento en producción de 0.5418, mientras que el

menor fue grano quebrado de maíz ( $3.7 \times 10^7$  conidios/g) con una tasa de crecimiento en producción de 0.1908; todos los sustratos sin diferencias significativas en la viabilidad de conidios, superior al 90% en todos los sustratos, para el almacenamiento, el grano quebrado de maíz, grano de arroz y grano de sorgo requieren de 10 días para humedad requerida, menor al 15%, según control de calidad. Posteriormente se determinó la tasa de decrecimiento de viabilidad de conidios durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración ( $2^{\circ}\text{C}$ ) y en condiciones ambientales normales, en donde el mejor sustrato fue el grano de sorgo en refrigeración con -0.22% de decrecimiento y viabilidad de 91.4% a los 40 días de almacenamiento.

En los servicios prestados durante el periodo de EPS en el Ingenio Magdalena se encuentra la evaluación de la residualidad de cristales de *Bacillus thuringiensis*, base del producto Dipel® 6.4 WG, con diferentes soluciones coadyuvantes para el control de gusano barrenador del tallo *Diatrea crambidoides*, donde el producto biológico Dipel® WG con Carbón activado como coadyuvante y melaza como coadyuvante lograron mantener la mortalidad superior al 25% hasta el día 27 considerándose entonces como los productos con mayor residualidad, a pesar que el valor de la misma disminuyo considerablemente en el tiempo.

De igual manera se realizó la Evaluación del rendimiento de unidades formadoras de colonias –UFC- y calidad de antagonismo de diferentes cepas de *Trichoderma harzianum*, en la cual las cepas CG 14-18 y CG 14-19 presentan rendimientos medios generales mayores a las demás cepas ( $9.33 \times 10^7$  conidios/g) y ( $8.67 \times 10^7$ ), mientras que en las pruebas de control de calidad antagónica, cultivos duales las cepas CG 14-18 y CG 14-19 presentaron de igual manera los mejores resultados en la supresión del crecimiento de micelio de *Cephalosporium sacchari* sp, mientras que en la prueba de placas sobrepuestas las cepas CG 14-10, CG 14-16 y CGL 14-13 presentan el mayor nivel de antagonismo en comparación al cultivo testigo con valores superiores al 15% considerándose como las mejores cepas productoras de compuestos volátiles, sin embargo se observa que el micelio de *Cephalosporium sacchari* expuesto a la cepa CG 14-19 presenta el crecimiento radial superior al testigo, razón por la cual contiene valor negativo de porcentaje de antagonismo, por lo que el crecimiento micelial se observa potencializado.





## **CAPÍTULO I**

DIAGNÓSTICO GENERAL DEL ÁREA DE INVESTIGACIÓN EN CONTROL DE PLAGAS Y MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA (BioMAG), DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA ESCUINTLA, GUATEMALA. C.A



## 1.1. Presentación

El Ingenio Magdalena S.A. productor de azúcar para exportación entiende que al utilizar el sistema de monocultivo extensivo para alta producción, el mismo es demandante de gran cantidad de recursos, además de afectar directamente la flora y fauna local, también utiliza gran cantidad de pesticidas en el proceso de producción; en los últimos años con el auge del enfoque ambientalista mundial a futuro que promueve la utilización de manejo integrado de plagas; dicho manejo promueve alternativas sustentables el mantenimiento de la densidad poblacional dentro de regímenes de daño aceptables, los cuales no afectan la producción de manera significativa.

En el año 2008 el Ingenio Magdalena implementa el programa de producción de organismos entomopatógenos, utilizados para el control biológico de plagas en el cultivo de caña de azúcar, con capacidad mínima de 45,000 dosis por temporada (marzo-Octubre) (informática, 2008) esto con el fin de reducir paulatinamente la utilización de plaguicidas, con una disminución drástica de los costos de control de plagas.

Debido a las razones antes mencionadas, fue creada el área de investigación en control de plagas y microorganismos, como área específica, el presente documento busca determinar el estado actual del departamento y su problemática actual, por lo que se realizó el diagnóstico del área y fueron propuestas soluciones viables para mitigar los problemas inmediatos.

## 1.2. Marco Referencial

### 1.2.1. Descripción general del área

El Departamento de Biotecnología del Ingenio Magdalena –BioMag- se encuentra ubicado en la finca San Patricio la cual está ubicada en el municipio de La Democracia, Departamento de Escuintla a 106 kilómetros de la ciudad capital de Guatemala.

Dicha finca se encuentra a 48 msnm (metros sobre el nivel del mar), a latitud norte  $14^{\circ} 7' 39.39''$ , longitud Oeste  $90^{\circ} 57' 54.11''$ . Sus colindancias son: al norte con las fincas Santa Cristina, 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 1 (Del Cid J. , 2011).



*Figura 1. Ubicación geográfica de la finca San Patricio, Municipio de La Democracia, Escuintla*

### 1.2.2. Instalaciones

Las áreas presentes en el departamento de Biotecnología –BIOmag- del ingenio magdalena son:

- A. Laboratorio de producción de entomopatógenos: se encarga de identificar y aislar cepas virulentas de microorganismos que afecten a las plagas del cultivo de caña de azúcar para producirlas masivamente y distribuir las en las fincas de producción, programa preventivo de plagas, además de comercializar los excedentes entre clientes interesados en la implementación de dicho programa, Figura 2.



*Figura 2. Instalaciones del laboratorio de producción de organismos Entomopatógenos,*

- B. Laboratorio de producción de plantas (biofábrica): encargada de la propagación de nuevas variedades de caña de azúcar para futuras producciones, variedades que aún se encuentran en fase de investigación para posterior validación, con la técnica de cultivos in vitro para mantener las características deseadas en el genoma de las nuevas plantas, sin alteración por recombinación genética.
- C. Área de Investigación en control de plagas: encargada de la sistematización y validación de investigaciones, para actualizar la información internacional referente a control de plagas en caña de azúcar, con manejo integrado enfocado a identificar condiciones

promotoras de epizootias, fenómeno que conlleva a pérdidas en rendimiento de tonelaje por hectárea.

- D. Área de aclimatación de plantas: encargada de brindar condiciones de sustrato y manejo agronómico, para incentivar rápido y consistente desarrollo radicular de plantas provenientes del área de propagación in vitro, ya que las raicillas desarrolladas sobre el medio de cultivo son poco consistentes, Figura 3.



Figura 3. Área de aclimatación de plantas de caña de azúcar salidas de la biofábrica.

- E. Área de manejo de desechos: Encargada de Recolectar y brindar adecuado manejo a desechos producidos en el área agrícola e industrial del ingenio magdalena, con el fin de aprovechar los desechos como materia prima para elaborar subproductos que generen ingresos para el departamento.
- F. Área de cultivos varios: El ingenio magdalena cuenta con diversas líneas de investigación y producción en cultivos diferentes a la caña de azúcar, tales como ornamentales, orquídeas, cartucho (*Zantedeschia sp.*), Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), *Anthurium sp.*, *Bromelia sp.*, *Stevia sp.*, además de plantas frutales y forestales los cuales suplen la demanda de cultivos diferentes a las fincas productoras de caña de azúcar, Figura 4.



*Figura 4. Área de Cultivos varios del departamento de biotecnología -BIOMag-*

- G. Área administrativa: Encargada de la dirección del área y control de los procesos de las demás áreas productivas, centro de toma de decisiones del departamento.
- H. Bodega y almacenaje: Encargada de contener y distribuir los insumos necesarios en las diferentes áreas, además de las herramientas requeridas para el manejo de los cultivos y demás áreas dentro del departamento de biotecnología –BIOMag-, Figura 5



*Figura 5. Bodega del departamento de biotecnología -BIOMag-*

### **1.2.3. Plagas más Importantes que afectan el cultivo de caña de azúcar en Guatemala:**

#### **A. Chinche Salivosa:**

Los géneros existentes en Guatemala desde los 10 msnm hasta los 1700msnm: *Aeneolamia* y *Prosapia*, con el primer género según (Saenz, Salazar, Rodríguez, Alfaro, & Oviedo, 1999), el cual causa grandes daños a la caña de azúcar.

Las especies del género *Aeneolamia* se encuentran en América Central y en toda la región oriental de América del Sur, en tanto que el género *Prosapia* está limitado a los países de América Central, *Aeneolamia postica* es la especie más importante para Guatemala.

Dicha plaga puede desarrollarse en hospederos alternos como pastos y malezas gramíneas. (Camo, 1999), estos pueden causar 2 tipos de daño:

- El daño provocado por la ninfa al alimentarse de las raíces y tallos de la planta
- El daño provocado por el adulto al alimentarse de retoños y hojas.

Cuando se alimentan de hojas se puede observar al principio pequeñas manchas amarillo-rojizas sobre las hojas que posteriormente provocan la clorosis del follaje y la aparición de tejidos necrosados, provocan también intoxicación sistemática por inyección de líquido caustico que contiene enzimas que desdoblan el azúcar cristalizable lo que afecta su calidad. El aspecto de plantación infestada se presenta como la sequía intensa; las plantas no mueren pero sufren retraso en su desarrollo y la disminución del rendimiento en 5-8 ton/ ha (Camo, 1999).

Cuando el cultivo pasa por rebrote de esquejes, el ataque puede ser más intenso pues tanto las ninfas como los adultos causan mayor daño en los retoños que en plantas adultas, Se puede considerar que la cantidad de cinco ninfas por metro lineal de un surco son suficientes para efectuar el control más adecuado, el cual puede ser biológico o químico, Figura 6.



Figura 6. Estado ninfal, ciclo del cultivo y adulto de chinche salivosa *Aenolamia* sp.

## B. Gusano Barrenador del tallo

El barrenador de la caña (*Diatraea* sp) de la familia Crambidoae. Es nativa del Caribe, América Central, y las partes más cálidas de América del Sur, es considerada una plaga de importancia en los cultivos de caña de azúcar y otros como el maíz, el arroz y el sorgo.

La biología de la larva según (Morales Molina, 2008) describe la Larva blanca cremosa, con puntos oscuros y un escudo pro torácico café rojizo; Pupa, con protuberancias puntiagudas como cuernos en la cabeza; adulto, tiene un diagonal de puntos café, más o menos marcado en las alas delanteras, pero la identificación positiva sólo puede hacerse con el estudio de los genitales.

Importancia económica: en caña de azúcar puede llegar a producir daños de relativa importancia económica sólo durante las primeras etapas de crecimiento, hasta que la planta o el brote alcanza alrededor de 50 cm. de altura, (Hernandez, 1994).

Daños: En la caña recién brotada, ocasionalmente se comporta como gusano cortador al realizar cortes de los retoños a la altura de cuello de la raíz, hacen túneles en los entrenudos, reduce el vigor de la planta, hacen que se quiebre o se muera la parte distal del tallo, Figura 7.

Daños indirectos: por medio de los orificios y galerías horizontales penetran hongos oportunistas como *Colletotrichum falcatum* Wentt y *Fusarium moniliforme* Sheldon, que son los causantes de la pudrición roja (Morales Molina, 2008), responsables de la inversión de la sacarosa, ya que disminuye la cantidad y pureza del jugo que se extrae de la caña de azúcar, el cual tiene bajo contenido de sacarosa, como de 10% a 20%, por tanto, es menor el rendimiento de azúcar y alcohol.

En el área administrada por el ingenio magdalena la especie más predominante en cuanto a daño es *Diatraea crambidoides*



Figura 7. Larvas barrenadoras del tallo de caña de azúcar *Diatraea* sp.

a. Intensidad de daño:

En la zafra 2012/2013 en Guatemala (CENGICAÑA, 2013) reportó que el Barrenador del tallo sigue, por lo que es plaga de importancia económica ya que 35,420 hectáreas fueron reportadas con valores superiores al umbral económico (2.5%), de las cuales en el estrato litoral se ubicaron 22, 993 ha (64.9%). La

pérdida bruta estimada fue de 8,555 TM de azúcar, que representó incremento del 11%, respecto al registrado en la zafra 2011-2012.

b. Control Biológico:

El uso de *Trichogramma sp.* en la industria azucarera de Guatemala desapareció al igual que *Paratheresia claripalpis*, mientras que *Cotesia flavipes* incrementó a 17,456 hectáreas debido al mayor uso por parte del ingenio Pantaleón y Magdalena.

(Hernandez, 1994) Reporta que formulaciones de *Bacillus thuringiensis* también mostraron incremento con 12,906 hectáreas aplicadas, especialmente en aplicaciones aéreas. El total de área neta aplicada con productos biológicos fue de 32,687 hectáreas, equivalente a 27 por ciento del área monitoreada en la agroindustria, se muestra el proceso de infección en la Figura 8.

Dentro del control cultural fue importante la requema de los residuos de cosecha y la extracción de corazones muertos para la eliminación de larvas en la etapas de amacollamiento. No obstante las evaluaciones con productos químicos de nueva formulación realizadas con CAÑAMIP-CENGICAÑA (comité de manejo integrado de plagas), el uso es todavía muy bajo.

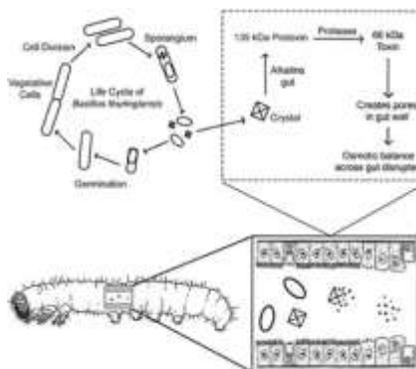


Figura 8: Proceso de infección utilizado por *Bacillus thuringiensis* en larvas del orden *Leptidoptera*

### c. Métodos de Cría:

Se caracterizan por el tipo de alimento suministrado a las larvas durante el desarrollo. Puede ser natural, Si se utilizan plantas o parte de ellas que normalmente son hospederas del insecto en la naturaleza, o artificial, Si el alimento suministrado ha sido elaborado por el hombre. El método natural consiste en colocar posturas (huevos) de la plaga, a punto de emerger, o larvas recién eclosionadas sobre partes de plantas frescas que faciliten la alimentación y desarrollo. Generalmente, las larvas son confinadas en recipientes de diferentes dimensiones y tipos, estos pueden ser de cristal, plástico o latón.

### C. Saltón Coludo

Insecto *Saccharosydne saccharivora* del orden hemíptera, familia Delphacidae, en su estado adulto presenta una coloración verde pálido y una envergadura que alcanza los 4 mm, Actualmente es considerado como una plaga importante en el cultivo de caña de azúcar debido a su frecuente incidencia y a la severidad del daño que puede generar a la planta principalmente en áreas cercanas al departamento de Retalhuleu.

Como se puede inferir según (Guagliumi, 1953), el ciclo de vida del insecto es simple y de corta duración, por lo que generalmente pueden presentarse varias generaciones del insecto durante el ciclo del cultivo, situación que dificulta la labor de control.

El insecto (ninfas y adultos) presenta un aparato bucal picador-chupador (estilete), por lo que se alimenta con la extracción de la savia de las hojas desde el envés. Se ha observado que el insecto manifiesta cierta preferencia sobre algunas variedades de caña de azúcar, factores como la dureza, la presencia de pelos en la vaina o la cantidad de cera en la hoja son características preferidas por el insecto.



Figura 9. Estado adulto y estadios ninfales de saltón coludo  
*Saccharosydne saccharivora*

#### D. Roedores

*Sigmodon hispidus* es la especie con más amplia distribución en las zonas agrícolas del país. Los perjuicios ocasionados por daños directos e indirectos en varios cultivos podrían superar al de otras plagas.

Características de la especie: Esta especie es originaria de Centro América y es la más abundante en mesoamérica, La forma del cuerpo es robusta, la coloración va de café grisáceo a café oscuro con café amarillento. La cola, gruesa, casi desnuda y escamosa, es más corta que la longitud del cuerpo. Son muy fecundas, se reproducen todo el año; producen entre 5 a 8 camadas, de 2 a 12 crías, al año. El periodo de gestación es de 21 a 27 días. Las crías son precoces y maduran sexualmente a los 2 o 3 meses.

Hábitos: según (Estrada, Salazar, & Carrillo, 1996) estos roedores tienen preferencia por habitar lugares enmalezados o con cobertura vegetal densa y baja que le permita refugiarse y protegerse de los depredadores. Esta condición, sumada a la disponibilidad de alimento y agua crea el ambiente propicio para la cría y multiplicación.

Daños: La rata ataca preferentemente la caña madura y los entrenudos basales. Los tallos al caerse pueden ser dañados en toda longitud, Figura 10.



Figura 10. a) Adultos de roedores que afectan la caña de azúcar, b) Daño directo causado por el roedor en tallos de caña de azúcar

En todas las plagas identificadas anteriormente el departamento de investigación en plagas y microorganismos promueven la ejecución del programa de manejo integrado de plagas en el cual se tome en cuenta la biológica de la misma y estrategias de control diversas al control químico clásico.

#### 1.2.4. Proceso de producción de organismos entomopatógenos

Los microorganismos producidos masivamente en el departamento son:

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

Los procesos necesarios para la producción masiva de dichos microorganismos son:

- A. Revigorización de la cepa seleccionada en el hospedero específico para cada uno, *Metarhizium*-Chinche salivosa, *Trichoderma*-hongos radiculares, *Beauveria*-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 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 del microorganismo
- J. Control de calidad.

Dicho proceso es aplicable a la producción de los microorganismos antes mencionados con la variación en los periodos entre procesos, Figura 11.

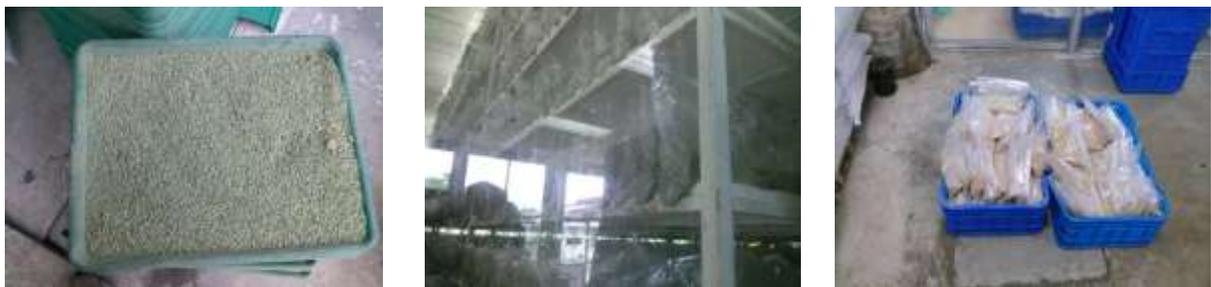


Figura 11. Producción de *Trichoderma harzianum* en instalaciones del laboratorio BIOMag

### 1.2.5. *Bacillus thuringiensis*:

(Sauka & Benintende, 2008) citan que *B. thuringiensis* es un bacilo gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar. Es microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa. Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina. Sin embargo, la característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry (del inglés, Crystal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial.

#### A. Mecanismo de acción:

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva. Bajo la forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial. Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia la cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular. Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares

hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial. Por otro lado, con base en experimentos in vitro y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina. Este último clivaje induce el ensamble de los monómeros y se establece la forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de poro en el epitelio del intestino medio, esto provoca desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular. El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células vegetativas en el hemocele del insecto. La mortalidad inducida por *B. thuringiensis* dependería en esencia de ciertas bacterias entéricas que son parte de la microbiota normal del intestino del insecto susceptible, ya que sólo *B. thuringiensis* no sería suficiente. Estas bacterias serían responsables de causar la septicemia en el insecto luego de que *B. thuringiensis* les permite alcanzar el hemocele tras dañar el epitelio intestinal

#### B. Producto Dipel 6,4 WG ®:

Ingrediente activo: *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki, según (Marquez, Callejas, & Lopez, Entomología CENGICAÑA, 2006) Modo de acción: Actúa por ingestión al producir septicemia por la acción toxica de los cristales y esporas de la bacteria que se producen dentro de las larvas del orden lepidóptera. Dosis: En aplicaciones terrestres el fabricante recomienda aplicar 250 - 500 gramos/ ha con 200 litros

### 1.2.6. Normas de higiene y Bioseguridad utilizadas

Debido a los procesos realizados en los laboratorios de Producción de entomopatógenos y biofábrica, es necesario mantener programas de bioseguridad estrictos para evitar contaminación de procesos o pérdida de material.

En el departamento se identifican estructuras diseñadas especialmente para mitigar en cierta medida el ingreso de sustancias u organismos que puedan afectar el desarrollo de los procesos productivos, se presentan algunos ejemplos a continuación:

- Rodiluvios, pediluvios, Figura 12.



Figura 12. Estructuras físicas de bioseguridad, a. Rodiluvio, b. Pediluvio

- Aislamiento de áreas de producción, Figura 13.



Figura 13. Aislamiento de áreas de inoculación, laboratorio de producción de entomopatógenos

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. General**

Conocer el estado actual del área de investigación en control de plagas y microorganismos del Ingenio Magdalena, Municipio de la Democracia, Escuintla.

### **1.3.2. Específicos**

- Determinar los componentes naturales, sociales, económicos y productivos que caracterizan al área de Investigación en control de plagas del ingenio Magdalena.
- Identificar las principales ventajas y limitantes que hay en el desarrollo del programa utilizado en el área de investigación en el manejo integrado de plagas dentro del sistema productivo del cultivo de caña de azúcar en el ingenio magdalena.
- Proponer alternativas de solución a los principales problemas identificados en el diagnóstico para el área de investigación en control de plagas.

## **1.4. Metodología**

Se utilizó la metodología convencional, con sondeos y entrevistas semi-estructuradas al personal del departamento de investigación en control de plagas.

### **1.4.1. Fase previa al trabajo de campo**

- Se recopiló información a través de fuentes secundarias contenidas en la biblioteca de CENGICAÑA y literatura presente en el departamento de investigación en plagas de ingenio magdalena.
- Se realizó el esquema para la entrevista semi-estructurada con el fin de determinar problemáticas en el departamento de investigación.

### **1.4.2. Trabajo de campo**

- Se caracterizaron las plagas principales que afectan el cultivo de caña de azúcar y los enemigos naturales, además se realizó recorrido y observación general del área esto con el fin de recopilar información geográfica y natural en las áreas del ingenio magdalena.
- Además se realizó la entrevista semiestructurada al personal del departamento de investigación en control de plagas para identificar la funcionalidad y los objetivos de las unidades productivas del departamento de investigación en control de plagas. Además fue documentado con imágenes fotográficas las instalaciones del departamento.
- Análisis FODA: Se identificaron las principales ventajas y limitantes, tanto internas como externas, del departamento. Con base en esto, se plantearon estrategias que permitan solventar los problemas identificados y también

fueron propuestas alternativas que potencialicen los factores positivos del departamento.

### **1.4.3. Fase posterior al trabajo de campo**

- Se analizó y discutió la información recopilada del trabajo de campo, para ser sistematizada y crear el presente informe final de diagnóstico.

## **1.5. Resultados**

En base a los datos recopilados anteriormente se realizó el análisis FODA del departamento de biotecnología –BIOMag- en el área de investigación de plagas y microorganismos describiéndose a continuación:

### **1.5.1. Fortalezas**

Infraestructura identificada como una de las fortalezas a corto plazo ya que las instalaciones actuales cuentan con áreas funcionales de producción y maquinaria apta para producción masiva de microorganismos.

Localización estratégica al estar a 4 kilómetros de la finca buganvilia en la cual se encuentra la fábrica de producción de derivados de la caña de azúcar y finca administrativa central del ingenio magdalena.

Financiamiento continuo por parte del ingenio magdalena por ser áreas funcionales de producción de hongos benéficos y plantas de cultivo in vitro.

Enfoque en alternativas no químicas de control, ya que el departamento busca la reducción de la utilización de productos químicos y la conservación de la fauna benéfica nativa.

### 1.5.2. Oportunidades

Corriente de “producción amigablemente ecológica” por ser mega tendencia del cuidado del medio ambiente en los mercados internacionales.

Área de investigación específica, no presente en otros ingenios ya que adjuntan el área de investigación al área de producción lo que da lugar a limitaciones para establecer ensayos nuevos.

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.

### 1.5.3. Debilidades

Infraestructura es considerada también como debilidad a largo plazo ya que la producción de microorganismos benéficos presenta aumento anual, esto conlleva a que el espacio físico disponible sea cada vez más limitado.

Inicio en investigación de microorganismos, debido a que el programa de investigación de microorganismos benéficos es de reciente creación lo que conlleva a que la experiencia del mismo aún está en construcción.

Falta de personal ya que solo se cuenta con investigador en control de plagas ya que puede ser área con mayor explotación.

### 1.5.4. Amenazas

Ingreso constante de personal de fincas externas lo que conlleva a mantener constante amenaza de contaminantes externos para la producción de microorganismos.

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.

Monocultivo extensivo lo que provoca cierta vulnerabilidad a organismos patógenos del cultivo.

Variación climática a lo largo del tiempo lo que genera condiciones ideales para la aparición de epizootias de plagas de importancia.

## **1.6. Conclusiones**

1.6.1. El departamento de biotecnología magdalena -BIOMag- presenta 8 áreas funcionales con funciones específicas de apoyo al cultivo de caña de azúcar del ingenio magdalena.

1.6.2. Se identificaron diversas ventajas del departamento, las principales la ubicación e instalaciones óptimas para el desarrollo, desinfección e aislamiento de microorganismos benéficos.

1.6.3. Se identificación diversas limitantes del departamento con la principal la reciente creación sin embargo la investigación constante disminuirá este efecto.

## **1.7. Recomendaciones**

- 1.7.1. Se recomienda la constante investigación en el departamento para aumentar la experiencia en la producción de microorganismos benéficos.
- 1.7.2. Se recomienda analizar la posible expansión de las instalaciones actuales para la producción de microorganismos en el aumento anual y de la demanda de los mismos.
- 1.7.3. Se recomienda realizar el inventario entomológico y de microorganismos benéficos en fincas estratégicas del ingenio magdalena.

## 1.8. Referencias

Camo, T. R. (1999). Evaluación de cuatro aislamientos de *Metarhizium anisopliae* para el control microbiano de chinche salivosa (*Aenoloamia* sp.) bajo condiciones controladas. Guatemala, Guatemala: Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

CENGICAÑA. (2013). Informe anual, 2012-2013. Guatemala: CENGICAÑA.

Del Cid, J. (2011). Localización de fincas Ingenio Magdalena (correo electrónico). Ingenio Magdalena, SIG. Escuintla, Guatemala.

Estrada, J., Salazar, R., & Carrillo, E. (1996). Estimación de pérdidas causadas por la rata cañera, en caña de azúcar variedad CP-72 2086. I Simposio Nacional de Plagas de la Caña de Azúcar (págs. 104-111). Guatemala: CAÑAMIP.

Guagliumi, P. (1953). El saltahoja de la caña de azúcar *Saccharosydne saccharivora* Westw. y la fumagina en Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría. Instituto Nacional de Agricultura. Venezuela. Boletín Técnico numeror 7, 1-82.

Hernandez, O. (1994). Evaluación de dos ingredientes de la dieta para reproducción artificial del gusano barrenador de la caña de azúcar *Diatraea sacharalis*. Escuintla: Universidad de San Carlos de Guatemala.

informatica, D. d. (2008). Ingenio Magdalena S.A. Recuperado el 27 de 09 de 2015, de [http://imsa.com.gt/sitio/page\\_historia](http://imsa.com.gt/sitio/page_historia)

Marquez, J. M., Callejas, A., & Lopez, E. (2006). En Entomología CENGICAÑA (pág. 119.124). Escuintla: CENGICAÑA.

Morales Molina, M. (2008). EVALUACIÓN DE CUATRO PARASITOIDES PARA EL CONTROL DE DOS ESPECIES DE BARRENADORES *Diatraea saccharalis* Fabricius y *Diatraea crambidoides* Grote EN CAÑA DE AZÚCAR A NIVEL DE LABORATORIO. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

Saenz, C., Salazar, D., Rodriguez, A., Alfaro, D., & Oviedo, R. (1999). MANEJO INTEGRADO DEL SALIVAZO, *Aeneolamia* sp y *prosapia* sp. en la regiones cañeras de Costa Rica. XI Congreso Nacional Agronómico / IV Congreso Nacional de Entomología (págs. 155-159). Direccion de Investigacion y Extension de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA).

Sauka, D. H., & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología , 124-140.



## **CAPITULO II**

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* CEPA MAGDALENA, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A.

SOLID SUBSTRATE EVALUATION FOR MASIVE PRODUCTION OF *Trichoderma harzianum* MAGDALENA STRAIN, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A.



## 2.1. Presentación

Con este estudio se pretende reemplazar la aplicación de fungicidas químicos como Vitavax® (Carboxin + Captan) por la utilización de organismos antagonistas nativos, dicho fungicida es el principal insumo empleado para el control de pudrición del esqueje de caña de azúcar causado por patógenos del suelo en la propagación asexual, es aplicado a heridas provocadas durante la extracción del esqueje en semilleros comerciales, para renovación de plantaciones comerciales (Gomez, 2006), debido a la rápida y efectiva acción, sin embargo existen efectos indeseados sobre el ecosistema como: inducción de resistencia, persistencia de residuos tóxicos y posterior contaminación de suelo y agua.

Entre los organismos antagónicos nativos se encuentran las diversas especies del hongo *Trichoderma sp.* que ha sido catalogado como organismo eficiente en la producción de enzimas altamente nutritivas para la regulación de fitopatógenos, por lo que se utiliza con éxito en tratamiento de semilla y al sustrato contra hongos involucrados en el complejo “damping off” (*Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* y *Rhizoctonia solani*)

El microorganismo *Trichoderma harzianum* se desarrolla naturalmente en diversos suelos, condiciones ambientales y nutrimentales (Michel, Cepas nativas de *Trichoderma sp.* Euascomycetos, su antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES), Tesis Doctoral en biotecnología , 2001) debido a la alta adaptabilidad que presenta, sin embargo es necesario desarrollar técnicas que permitan de forma fácil, económica y efectiva la producción masiva de cepas nativas de *T. harzianum* con altos estándares de calidad sobre sustratos de bajo costo, para la posterior aplicación extensiva en áreas de cultivo de caña de azúcar.

El ingenio Magdalena S.A. busca expandir y diversificar la producción de organismos benéficos nativos; inició producción masiva de *T. harzianum* cepa magdalena en 2013,

sin embargo el sustrato grano de maíz quebrado presentó limitaciones, como alta contaminación y baja producción de conidios, situación que motiva la búsqueda de sustratos que propicien la mayor productividad y rentabilidad; a continuación se presentan los resultados de la producción de la cepa magdalena en diferentes sustratos solidos de beneficio para la institución.

## **2.2. Marco teórico**

### **2.2.1. Marco conceptual**

#### **A. Etimología**

El nombre del género *Trichoderma* proviene del griego *thríxótrichós*, pelos y *dérma*, piel, corteza; debido al aspecto macroscópico de las colonias, que crecen en sustratos celulósicos forma conidióforos erectos, solitarios o agregados. (Persoon, synopsis methodica fungorum, 1801) Citado por (Ullua & Herrera, Etimología e Iconografía de géneros de hongos , 1994).

#### **B. Historia**

*Trichoderma* fue descrito por Person en 1794, Según, (Villegas, Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. Para el manejo de la pudrición de la corona y raíz del manzano ( *Malus domestica* , Borkh), 2000), fue clasificado inicialmente dentro de la clase Gasteromycete que posteriormente se realizó análisis exhaustivo de la estructura y características por lo que se modificó en la clasificación hacia el género de los hongos filamentosos. Dicho hongo contiene propiedades y actividades biológicas de interés en el control biológico, por lo que 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 gran cantidad de

artículos técnicos se han escrito con descripción de las bondades en el manejo biológico de los cultivos agrícolas.

En el Cuadro 1 se presenta el resumen con los hechos históricos más importantes en el uso y clasificación del hongo *Trichoderma sp.*

Cuadro 1. Resumen histórico taxonómico del género *Trichoderma spp*

AUTOR	FECHA	COMENTARIOS
Person	1794	Introduce el género <i>Trichoderma spp.</i> , y describe a <i>T. harzianum</i> (Rifai), como sinónimo de <i>Pyrenium lignorum</i> var. Vulgare Tode(1790).
Fries	1829	Reduce la sinonimia de ambas especies a <i>T. viride</i> .
Harz	1871	Realiza la primera delimitación del género con base en observaciones microscópicas de las fiálides.
Tulasne	1860	Identifica a <i>Trichoderma spp.</i> , como Fungi Imperfecti.
Saccardo	1885	Crea el género <i>Pachybasium spp.</i> , para incluir a 13 especies de <i>Trichoderma spp.</i> , con <i>T. virie</i> .
Vuillemin	1887	Transfiere <i>T. viride</i> a <i>Acrostalagmus viride</i>
Brefeld	1891	Menciona que <i>Hypocrea rufa</i> es sinónimo de <i>T. viride</i> .
Oudemans y Koning	1902	Primera descripción de <i>Trichoderma spp.</i> , en el suelo. Qudemans identifica a <i>T. koningii</i> .
Cook v Taubenhau	1911	Reconocen diferencias entre <i>T. koningii</i> y <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oale	1912-1914	Describe a <i>T. koningii</i> , <i>T. lignorum</i> y <i>T. Álbum</i>
Goddard	1913	Describe a <i>T. nigroviren</i> .
Waksman	1916	Reporta 5 cepas de <i>Trichoderma spp.</i> , en el suelo.
Abbott	1926	Describe 4 especies, con a <i>Trichoderma lignorum</i> , <i>T. koningi</i> y <i>T. glaucum</i> .
Gillman y Abbott	1927	Construyen clave para identificar las especies de <i>Trichoderma spp.</i>

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 el género se establece con especie) y menciona que <i>Hypocrea gelatinosa</i> es en realidad <i>Trichoderma viride</i> .
Rifai y Webster	1966	Demostraron que la nomenclatura de Bisby era errónea al examinar las diferencias entre <i>H. rufa</i> , <i>H. aeuroviride</i> (Rifai), <i>H. vinosa</i> , y otras especies de <i>Hypocrea</i> spp., no mencionadas.
Rifai	1969	Hace revisión del género <i>Trichoderma</i> spp., ofrece clave de identificación de 9 especies describiéndolas ampliamente. Actualmente es la clave más aceptada.
Bissett	1984-1992	Realiza amplia descripción de <i>T. atroviride</i> (Bissett), la descripción original realizada por Karsten (1892) debe ser modificada y ampliada de acuerdo a las nuevas técnicas disponibles (la microscopia electrónica y la genética molecular).
Doyle, Seaby, Chen, Castle y Hermosa.	1991-2000	Diferenciaron cuatro formas biológicas o cepas 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 f. aggressivum</i> , en la planta de Hongos México.

FUENTE: (Rifai, 1969), (Bisset J. , 1991)

### C. Clasificación

(Michel, Cepas nativas de *Trichoderma* sp. Eufungi, su antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES), Tesis Doctoral en biotecnología , 2001) Cita que el género *Trichoderma* fue propuesto por primera vez por Person en 1794 con 4 especies, posteriormente Rifai en 1969 agrega 9 especies más, (Bisset J. , 1991) eleva algunas

de las especies agregadas por Rifai a rango de sección, agrupándolas en 4 secciones: Longibrachiatum, Pachybasium, Trichoderma y Hypocreanum.

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, *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus.*, 1996). Sin embargo, según (Lieckfeldt,, Kuhls,, & Muthumeenakshi, 1998) al utilizar técnicas moleculares, la frontera morfológica que define las especies con análisis ribosomal del DNA desaparecerá muchas de ellas y quedará menor número de especies reales que formen el género.

La clasificación taxonómica actual según (Villegas, Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. Para el manejo de la pudrición de la corona y raíz del manzano ( *Malus domestica* , Borkh), 2000) lo ubica dentro del reino Fungi en la división Mycota,

Dominio: Eukarya

Supergrupo: Unikonta

Subdivisión: Eumycota

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phyllum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Género: *Hypocrea* (Teleomorfo); *Trichoderma* (Anamorfo) (Holt & Ludica, *Taxa of life*, 2013)

Especies de importancia económica:

*T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link fr, *T. reesei* EG Simmons, *T. virens*, *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. lignorum* y *T. citroviride*. (Villegas, 2000)

#### **D. Descripción del hongo**

*Trichoderma* presenta micelio septado, conidióforos en segmentos cortos de manera bifurcada en la hifa, conidios redondeados.

El tamaño de los conidióforos varía entre 62.5-69 x 3-4,7  $\mu\text{m}$ . 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. El sistema de ramificación tiene apariencia piramidal, Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4  $\mu\text{m}$ ., con verticilos terminales de hasta 4 conidios de tamaño aproximado de 3,8-4 x 3,1-3,7  $\mu\text{m}$ , con forma citriforme y subglobosos.

La esporulación en parches verdosos según (Guzmán, 1977), presenta además estructuras conidiales hialinas uniceluladas con conidióforo ovoide hialino largo no verticilado que nace en centros pequeños.

Produce clamidosporas en sustratos naturales, estructuras para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas son distintivas al ser globosas a subglobosas, terminales o intercalares de color verde formadas por el micelio sumergido, de pared dentada y menores a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, es considerado también organismo saprofito del suelo y madera, el crecimiento en el suelo es más rápido que en madera (Samuels, *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus.*, 1996).

Los conidios son lo más viable 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. 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 las conidios. 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.

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.

Se define como como unidad formadora de colonia o UFC a toda estructura fúngica que es capaz de generar el nuevo organismo, considerándose como precursor del mismo. En dicha investigación se realizará determinación de concentración únicamente para conidios de *T. harzianum* por gramo de sustrato sólido.

## **E. Biología**

*Trichoderma sp*, se encuentra presente especialmente en el suelo, mayormente en los suelos que contienen abundante materia orgánica ya que en dichos medios la disponibilidad de microflora y alimento es mayor. Por la relación con la materia orgánica se encuentra clasificado en el grupo de hongos hipógeos, es hongo que se desarrolla y madura los cuerpos fructíferos bajo el suelo y lignícolas 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.

Se presentan diferencias entre especies del género de acuerdo al tipo de suelo encontrándose mayor diversidad de las mismas en suelos con alto contenido de materia orgánica, también son determinantes los aspectos temperatura y contenido de humedad del medio en el cual habitan.

En el estadio temprano de *T. harzianum* (Rifai), el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias del mismo (Rifai), crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de dextrosa y papa (PDA) a 25°C. Las especies de este género generalmente prefieren pH ácido de 4.5- 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 parasexual, 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 (Rifai, 1969) (Samuels, *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus.*, 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* no tienen solamente el periodo asexual simple, sin embargo solo en pocas líneas ha sido posible identificar el periodo sexual como se muestra en la Figura 14. Formas de reproducción utilizadas por *Trichoderma* sp, cuando dicha fase se produce, este organismo se encuentra clasificado en la clase Ascomycete y el género *Hypocrea*, ninguna línea utilizada en programas de control biológico ha sido posible la identificación de fase sexual, por lo que la mayoría de las cepas de este hongo están adaptadas al ciclo de vida asexual, (Michel, 2001).

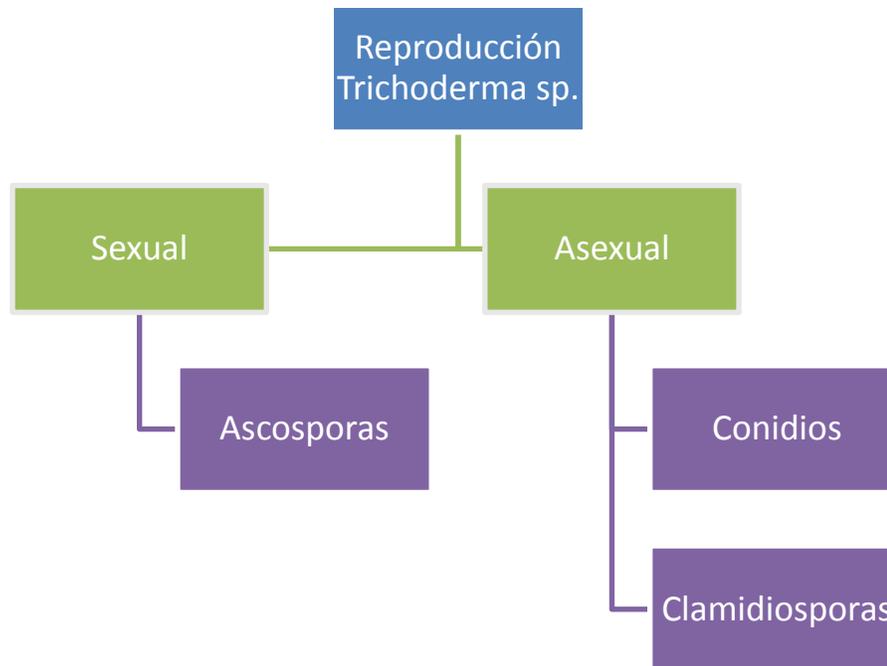


Figura 14. Formas de reproducción utilizadas por *Trichoderma sp*

En ausencia de meiosis durante la fase asexual, la plasticidad cromosómica es la norma, y diferentes cepas tienen diferentes números de cromosomas. La mayoría de las células tienen varios núcleos. Varios factores genéticos asexuales, tal como la recombinación parasexual, mutación y otros procesos que contribuyen a la variación. De este modo, el hongo se adapta y evoluciona rápidamente. Existe gran diversidad en el genotipo y fenotipo de las cepas silvestres.

## F. Ciclo de vida

Inicia cuando el organismo crece y se ramifica como hifa fúngica típica que mide de 5-10  $\mu$  de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5  $\mu$  de diámetro son liberadas en gran número. También se forman clamidiospora intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidiosporas se pueden fusionar como se muestra en la Figura 14.

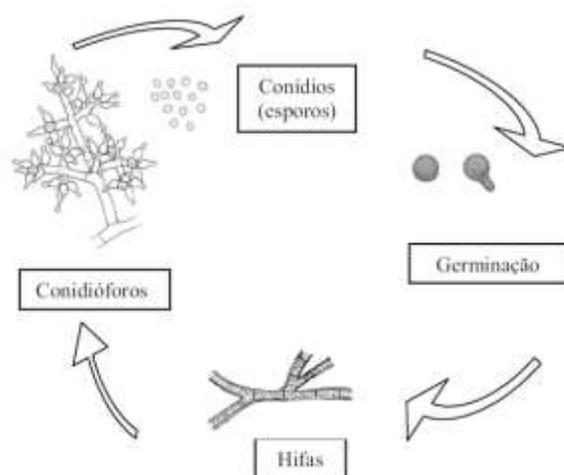


Figura 15. Diagrama del Ciclo de vida de *Trichoderma* sp.

FUENTE: (Kruger & Bacchi, 1995)

## G. Mecanismo de Acción

Harman (2006), cita 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 1920; sin embargo, Michel (2001), cita que algunas cepas son más eficientes para el control de patógenos que otras, y pueden ser en gran medida ineficaces contra hongos.

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

- Micoparasitismo

Según Harman (2006), los estudios de micoparasitismo demuestran que *Trichoderma* produce diversas enzimas antifúngicas (quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa), que degradan la pared celular de patógenos que añadido a lo citado por Alvarez & Sivila (2013), 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. aphani dermatum*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora nicotianae*, *Rosellinia necatrix*, *Fusarium oxysporum* y *F. roseum* (Stefanova & Sandoval, Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* sp. en el control de fitopatógenos de suelo., 1995; Naar & Kecskés, A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*, 1995) citado por Michel (2001).

- Competencia

Se 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 (Michel, 2001).

*T. harzianum* cepa (T-35) controla a *Fusarium* sp. en diversos cultivos, tales como melón y algodón, por medio del acelerado crecimiento en la rizósfera, ya que opera vía competencia por nutrientes (carbono-nitrógeno) y ocupación de espacio (Sivan & Chet, 1989).

- 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.) (Stefanova & Sandoval, 1995) estos metabolitos volátiles y no volátiles, son

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.

#### **H. Utilización en programas de control biológico**

Se ha utilizado en aplicaciones comerciales en plantaciones que utilizan el programa de uso limitado de productos químicos por características tales como la producción de enzimas altamente nutritivas y por la regulación de fitopatógenos, por lo que se utiliza 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 (Stefanova N. , 1997).

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% - 26% y *S. cepivorum* del 27%, añadido a incremento en producción en los tres casos (García, Salas, & Riera, 2005).

El aislamiento de 105 diferentes cepas nativas de Trichoderma 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, 2001).

## I. Producción masiva de *Trichoderma sp.*

Las necesidades nutricionales generales de *Trichoderma* son bien conocidas, es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para el crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). Así mismo, asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Gamez, Zapata, Oviedo, & 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 & Harman, 1992)

Por otro lado, el pH es importante tanto para manipular el crecimiento como para manipular la esporulación y la mayor longevidad, obteniéndose en medio con pH de 6.0 y permanecen viables las esporas en periodo de 45 días en el almacén, bajo condiciones de campo requiere humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo (Agosin, Volpe, Muñoz, San Martin, & Crawford, 1997).

*Trichoderma sp.* Como biocontrolador según cita (FERNANDEZ-LARREA, 2004) que 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.

### 2.2.2. Marco referencial

- **Descripción técnica de los tratamientos**

### a. Grano quebrado de maíz

El grano de maíz comprende un fruto independiente llamado cariósipide de la planta *Zea mays*, cada grano está formado por cuatro estructuras principales: el pericarpio o cáscara (elevado contenido de fibra, 87%), el germen o embrión, el endospermo (elevado contenido de almidón, 87%) y la piloriza (Benítez & Pfeiffer, 2006).

Dicho sustrato fue seleccionado como tratamiento debido a la alta disponibilidad del mismo en el área de la costa sur guatemalteca, además de poseer alto contenido de almidón y fibra en componentes estructurales Cuadro 2, para aumentar la disponibilidad de acceso a dichos nutrimentos en el crecimiento del micelio se utilizaron granos quebrados.

*Cuadro 2. Contenido nutricional del grano de maíz*

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7	8	18.4
Extracto Etéreo	1	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: (Watson, 1987) citado por (FAO, 1993)

### b. Grano de arroz

El grano de arroz de la planta *Oryza sativa* es clasificado como cariósipide. Cada grano se encuentra formado por el embrión, el endosperma (contiene gránulos de almidón), capas de aleurona (tejido rico en proteínas), tegmen (cubierta seminal), y el pericarpio (cubierta del fruto), (Pincirolí, Martínez, & Vidal, 2010)

El grano de arroz fue seleccionado como tratamiento debido a la alta disponibilidad del mismo en el área de la costa sur guatemalteca y fácil adquisición, además de ser el sustrato de principal para la producción de microorganismos entomopatógenos en las

instalaciones del ingenio magdalena; debido al alto contenido de proteína, almidón y fibra en componentes estructurales mostrado en el *Cuadro 3*.

**Cuadro 3. Composición aproximada del grano de arroz y fracciones**

	Arroz Cáscara	Grano integral	Grano pulido	Cáscara	Salvado	Embrión
Proteína	6.7 – 8.3	8.3 – 9.6	7.3 – 8.3	2.3 – 3.2	13.2 – 17.3	17.7 – 23.9
Lípidos	2.1 - 2.7	2.1 – 3.3	0.4 – 0.6	0.4 – 0.7	17.0 – 22.9	19.3 – 23.8
Fibra cruda	8.4 – 12.1	0.7 – 1.2	0.3 – 0.6	40.1 –53.4	9.5 – 13.2	2.8 – 4.1
Cenizas	3.4 – 6.0	1.2 – 1.8	0.4 - 0.9	15.3 – 24.4	9.2 – 11.5	6.8 – 10.1
Almidón	62.1	77.2	90.2	1.8	16.1	2.4

Fuente: (Pomeranz & Ory, 1982) citado por (Pincirolí, Martínez, & Vidal, 2010)

### c. Grano de sorgo

Componente reproductivo de *Sorghum halepense* clasificado como cariósipide, cada grano está formado por Pericarpio (alto contenido de fibra), testa, endosperma (alto nivel de almidón) y embrión, dicho sustrato fue seleccionado como tratamiento debido al alto contenido de almidón en componentes estructurales, como se muestra en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Análisis proximal promedio de las partes componentes del grano de sorgo**

Fracción	Porcentaje (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Almidón (%)
Grano entero	100.00	1.7	12.3	3.6	73.8
Endospermo	82.3	0.4	12.3	0.6	82.5
Germen	9.8	10.4	18.9	28.1	13.4
Pericarpio	7.9	2.0	7	4.9	34.6

Fuente: (Domanski, Giorda, & Feresin, 1997)

## d. Olate de maíz

El raquis de la inflorescencia de maíz, presenta elevado contenido de fibra y proteína, en el Cuadro 5 se muestra el análisis proximal del olate, componente ideal para crecimiento de organismos descomponedores de la materia orgánica.

Cuadro 5. Análisis Proximal del olate de maíz *Zea mays*

<b>Componentes</b>	<b>Olate de Maíz</b>
Materia seca	91.9%
Extracto Libre de nitrógeno	48.1%
Extracto Etéreo	0.9%
Fibra cruda	38.9%
Proteína cruda	2.4%
Nitrógeno	0.39%
Cenizas	1.6%

Fuente: (Calderon, 2009)

## e. Melaza

Residuos de la cristalización final del azúcar de las cuales no se puede obtener más azúcares por métodos físicos en el procesamiento de la caña de azúcar, presenta elevado contenido energético en forma de Sacarosa, el Cuadro 6 muestra el análisis proximal.

Cuadro 6. Composición de la melaza de caña de azúcar

<b>Componente</b>	<b>Contenido (p/p)</b>
Materia seca	78%
Proteínas	3%
Sacarosa	60-63%
Diferentes azúcares	4-8%
Agua	16%
Grasas	0.40%
Cenizas	9%

Fuente: Tellez, 2004 citado por Fajardo &amp; Sarmiento, 2007.

La melaza fue seleccionada como complemento al tratamiento de olote de maíz, ya que dicho sustrato presenta valores bajos de carbohidratos, además de ser un subproducto de la industrialización de la caña de azúcar, por lo que existe alta disponibilidad en el área.

### **A. Antecedentes**

- a. Calvacante, Lima, Pinto, & Gava (2008), citan que utilizaron sustratos de bajo costo para la producción de esporas de *Trichoderma*: arroz, salvado de maíz y salvado de trigo fueron utilizados como sustratos sólidos para el desarrollo de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma polysporum* sin adición de fuentes externas nutricionales, únicamente se agregó humedad en forma de agua desmineralizada, los sustratos fueron esterilizados, inoculados y cultivados a 30 °C, por 7 días, donde el salvado de trigo fue el mejor sustrato para la producción de esporas de *Trichoderma* para todas las cepas evaluadas, los conteos más elevados de concentración de esporas se presentaron en *T. harzianum* ( $28.3 \times 10^8$  esporas/g) y *T. viride* ( $24.1 \times 10^8$  esporas/g).
- b. Rajput, Khanzada, & Shahzad (2014), evaluaron 9 diferentes sustratos para el desarrollo de *Trichoderma harzianum*: grano de arroz, grano de sorgo, grano de trigo, grano de mijo, paja de trigo, cáscara de arroz, estiércol de vaca, aserrín y gallinaza, donde el grano de sorgo seguido por el grano de mijo fueron los sustratos con mejores resultados; la gallinaza presentó los peores resultados, mientras los sustratos grano de arroz, grano de trigo, paja de trigo y cascara de arroz presentaron un desarrollo de micelio aceptable. La mejor fuente de carbono identificada fue sucrosa, de manera similar el nitrato de amonio (3,000 ppm) se presentó como la mejor fuente nitrogenada, al presentar los resultados de mayor crecimiento de colonia y producción abundante de conidios; el uso combinado de sucrosa como fuente de carbono y nitrato de amonio como fuente nitrogenada (ambos 3,000 ppm) presentó correlación positiva en incremento del

crecimiento micelial y producción de conidios de *T. harzianum* en paja de trigo, cascara de arroz, grano de mijo; sin embargo dicha adición presento correlación negativa en grano de sorgo y arroz. Estudios de la vida media de micelio mostraron que en todos los sustratos se alcanzó el valor máximo en 60-75 días de incubación, con posterior declive gradual.

- c. Chávez-García, Montaña-Lara, Martínez-Salgado, Mercado-Reyes, & Rodríguez (2009), citan que el fin de evaluar el efecto de las condiciones de luz sobre la producción de biomasa de una cepa de *Trichoderma sp.* en fermentación sólida y sumergida, se probaron medios arroz 53% (p/p), arroz 53% (p/p)-melaza 3% (p/p) y arroz 53% (p/p)-melaza 10% (p/p) en agua destilada, con incubación 25°C y períodos de luz constante y fotoperíodo 24 h luz/24 h oscuridad durante 8 días. Los parámetros estimados fueron densidad poblacional (conidios/mL), germinación de esporas a 24 horas y porcentaje de pureza. Los resultados indicaron que el proceso de fermentación sólida con sustrato arroz-agua destilada a 25°C y la exposición constante a la luz permitió mayor recuperación de conidios (45x10<sup>18</sup> conidios/mL), con 96% de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92,1%. En la fermentación sumergida se obtuvo un porcentaje de pureza del 76,8% y la germinación de conidios a las 24 h fue de 91,2%, muestra como desventaja un bajo porcentaje de pureza frente a la fermentación sólida.
- d. Rini & Sulochana (2007), citan la evaluación de sustratos bovinaza, nim (*Azadirachta indica*), fibra de coco, grano de sorgo, aserrín y salvado de arroz individualmente y en combinaciones específicas para la producción masiva de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, con la adición de panela y harina de trigo en algunos tratamientos, con diferentes niveles de humedad. En donde los sustratos: grano de sorgo precocido, fibra de coco + nim (1:1) y bovinaza + nim (1:1) + harina de trigo (10%), mantuvieron alta población de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, 10 días después de la inoculación. La panela y harina de trigo funcionaron como suplementos nutricionales ya que aumentaron el número

de conidios de  $23.66 \times 10^8$  a  $34 \times 10^8$  y  $45.6 \times 10^8$  conidios/g respectivamente. Se percibió un aumento en la viabilidad de conidios a 30 días sin importar el sustrato o el nivel de humedad, Sin embargo la población inicial más elevada fue observada en grano de sorgo aun cuando la viabilidad fue menor en comparación a otros sustratos: la fibra de coco + nim (1:1) con 35% y 45% de humedad mostraron mayor viabilidad.

- e. Benites Bellino & Marroquín (2013), citan que la producción de *Trichoderma harzianum* se realiza mediante métodos artesanales, para cultivos líquidos, estáticos, sólidos y bifásicos. Uno de los sustratos más utilizados para la producción masiva de *T. harzianum* es la cáscara de arroz + harina de maíz; ésta tiene un costo relativamente alto y es de difícil adquisición. Esta investigación se estableció con el propósito de encontrar un sustrato orgánico, económico y de fácil adquisición en la región, con el que *Trichoderma harzianum* tenga una alta producción de esporas. En este estudio se evaluaron los sustratos: sorgo, maíz, olote y bagazo de caña. Después de los estudios realizados se obtuvo como resultado que el sorgo fue el mejor sustrato, tanto, en producción como en germinación de esporas.
  
- f. Michel-Aceves, Otero-Sánchez, Martínez-Rojero, Rodríguez-Morán, Ariza-Flores, & Barrios-Ayala (2008), citan que uno de los sustratos utilizados para reproducir a *Trichoderma spp.*, es el grano entero de arroz, el cual tiene costo relativamente alto. Con el propósito de encontrar un sustrato orgánico, económico y de fácil adquisición en la región, en el cual este hongo tenga un buen desarrollo y una alta producción de esporas viables, se estableció esta investigación que tuvo como objetivos evaluar 15 sustratos orgánicos en la reproducción masiva y viabilidad de esporas de *T. harzianum* y asociarlo con la composición nutrimental de los sustratos. Se evaluaron cáscaras de tomate (cáliz maduro acrescente de la flor, que encierra al fruto); arroz (glumas, lemas y palea de la flor); ajo (catáfilas coriáceas); cacao (testa de la semilla); ajonjolí (pericarpio del fruto); cacahuete (pericarpio del fruto); café (pericarpio del fruto);

vaina de frijol (pericarpio del fruto); olote de maíz (raquis de la inflorescencia femenina); granos de arroz, sorgo, alpiste y maíz; rastrojo de soya y maíz. Se utilizó un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones. Se cuantificó el número y porcentaje de viabilidad de las esporas y se correlacionó con el análisis químico proximal. El olote fue el mejor sustrato, tanto en la producción como en la germinación de esporas de *T. harzianum* con  $4.43 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup> y 99.0 % de viabilidad, respectivamente. Con base en el análisis químico proximal, el desarrollo del micelio, esporulación y viabilidad de las esporas, *T. harzianum* tiene una buena producción en aquellos sustratos orgánicos que tienen alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa, y un porcentaje intermedio de fibra.

## 2.3. Objetivos

### 2.3.1. General

Establecer el o los sustratos que presenten características idóneas para la producción masiva de propágulos viables de *Trichoderma harzianum* en el menor tiempo posible.

### 2.3.2. Específicos

- Determinar el efecto del sustrato evaluado sobre la producción y viabilidad de conidios de *T. harzianum* en, en función del tiempo.
- Determinar el periodo necesario para almacenamiento en los diferentes sustratos sólidos.
- Determinar el efecto de las condiciones de almacenamiento en la viabilidad de conidios de *T. harzianum*.

## 2.4. Hipótesis

El grano de arroz utilizado como sustrato representará el mejor sustrato para la producción de conidios de *T. harzianum*, debido a que presenta menor peligro de contaminación, con valores de viabilidad elevado por el contenido de almidón.

## 2.5. Metodología

### 2.5.1. Descripción de la investigación

#### **A. 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 matemático para dicho diseño experimental es el siguiente:

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

Donde:

- $Y_{ij}$  = variable respuesta de la ij-ésima unidad experimental
- $\mu$  = Media general de la variable respuesta
- $T_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento en la variable respuesta
- $E_{ij}$  = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

#### **B. Descripción de los tratamientos**

Para evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre la esporulación y formación de UFC, conidios, de *Trichoderma harzianum* se analizaron 5 diferentes tratamientos Cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos a evaluar en la investigación

Tratamiento	Sustrato	Presentación
T1 (testigo)	Maíz	Grano quebrado de maíz
T2	Sorgo	Grano cocido de sorgo
T3	Arroz	Grano pre-cocido de arroz
T4	Olote de maíz	Porciones de olote de maíz de 1 cm <sup>3</sup> aprox.
T5	Olote de maíz + solución melaza (10%)	Porciones de olote de maíz de 1 cm <sup>3</sup> aprox. + Residuo de industrialización de caña de azúcar

El sustrato utilizado durante la producción de la cepa magdalena, durante 2013 fue maíz quebrado, por lo que en la presente investigación fue utilizado como testigo o tratamiento control.

### **C. Descripción de la unidad experimental**

Cada unidad experimental constó de 1 bandeja de producción con 5 bolsas de producción resistentes al proceso de Esterilización de 30.5 cm de alto y 25.5 cm de ancho, con capacidad de 1 kg, las cuales se colocaron en estanterías con iluminación artificial, humedad y temperatura constante, 26 °C a unidad experimental, fue inoculada con 16 cc de solución con *T.harzianum* de  $2 \times 10^5$  ufc/ml, concentración modificada de la recomendación citada por Michel-Aceves, Otero-Sánchez, Martínez-Rojero, Rodríguez-Morán, Ariza-Flores, & Barrios-Ayala (2008), de  $1 \times 10^3$  ufc/ml. Desarrollado en medios de cultivo PDA + haba.

La cantidad de sustrato colocado en cada bolsa varía en función de la densidad, debido a que es necesario ocupar 1/3 del volumen total de la bolsa la cantidad de sustrato se presenta en la Cuadro 8.

*Cuadro 8. Cantidad de sustrato utilizado por bolsa para Esterilización húmeda en autoclave*

Sustrato a evaluar	Cantidad (g)
Maíz (testigo)	350
Sorgo	350
Arroz	350
Olote de maíz	250
Olote de Maíz + melaza	250

En la Figura 16, se muestra la presentación final de las unidades experimentales para cada tratamiento con los sustratos evaluados, en las instalaciones del laboratorio, en bolsas celofán.



*Figura 16. Unidad Experimental para cada sustrato evaluado*

#### ***D. Arreglo espacial de la investigación***

Se realizó el proceso de aleatorización de las unidades experimentales Figura 17, el espacio físico 4 estantes verticales divididos en 5 espacios horizontales, con los resultados finales presentados en la Figura 18.

Estante 1	T2	T3	T1	T2	T5
Estante 2	T3	T2	T4	T1	T2
Estante 3	T5	T5	T3	T5	T1
Estante 4	T4	T4	T1	T4	T3

*Figura 17. Distribución espacial de las unidades experimentales*



*Figura 18. Distribución espacial utilizada en la fase de bandeja para producción de estructuras reproductivas*

#### A. Concentración de conidios por gramo de sustrato

Se determinó por medio de conteos de concentración de conidios por gramo de sustrato con cámara de conteo Neubauer con diluciones sucesivas para cada sustrato.

#### B. Tasa de producción conidios

Se generó el modelo de regresión que simula el aumento exponencial de concentración de conidios para cada sustrato, con conteos diarios en la fase de formación de estructuras reproductivas.

#### C. Período de almacenamiento de sustratos

Con base a la deshidratación de los sustratos evaluados, se utilizó balanza higrométrica para determinar el nivel de humedad y el periodo para alcanzar humedad mínima permitida (15%) para almacenamiento.

#### D. Viabilidad de conidios

a. Viabilidad de conidios en cosecha

Se determinó la proporción de conidios viables de *T. harzianum* previo al almacenamiento, por medio de siembra de conidios en medio PDA y lectura a 17 horas.

b. Viabilidad de conidios en almacenamiento

Se determinó la proporción de conidios viables de *T. harzianum* durante 40 días en condiciones ambientales y en refrigeración (2°C) para generar la tasa de decrecimiento de viabilidad de conidios en ambas condiciones.

### 2.5.3. Manejo del experimento

A. Obtención de inóculo de *Trichoderma harzianum*

La cepa Magdalena fue aislada de suelos de la costa sur, se encuentra presente en el germoplasma del laboratorio de producción de entomopatógenos; debido al alto valor genético para el desarrollo óptimo se mantuvo 6 días en medio PDA + extracto de haba para crecimiento de micelio inicial, Posteriormente se colocó micelio en medios PDA para desarrollo masivo de micelio, por 4 días, sin embargo fue necesario eliminar el exceso de humedad para evitar contaminaciones externas, en condiciones homogéneas hasta 8 días, en salas especializadas con extractores de humedad; para la formación de la solución madre utilizada para la inoculación de los sustratos se extrajo el micelio y fue diluido en Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada, dicha solución es denominada matriz, flujograma presentado en la Figura 19.



Figura 19. Flujograma de la obtención y conteo de concentración de matrices madre para inoculación.

Posteriormente, realizadas las matrices con *T. harzianum*, se realizaron conteos de conidios, con la cámara de conteos de Neubauer, donde se determinó la concentración de UFC/ ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración UFC}}{\text{mL}} = \left( \frac{\bar{X} \text{ conteos}}{\text{campo}} \right) \times 10,000 \times \text{Volumen de matriz}$$

Con el uso del principio de concentraciones que se explica por la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración 1} \times \text{Volumen 1} = \text{Concentración 2} \times \text{Volumen 2}$$

Obtenido el dato de conidios/ml, se procedió a llevar todas las matrices a la misma concentración para mantener a los sustratos en las mismas condiciones iniciales, concentración de  $2 \times 10^5$  ufc/ml, por lo que se realizaron diluciones, Luego de la formación de la matriz madre con la concentración requerida, se tomaron 16 ml de dicha solución para agregar en los sustratos a evaluar.

#### B. Manejo de la Bioseguridad:

El manejo de la bioseguridad dentro del laboratorio es prioritario para evitar contaminación de los sustratos y presente sesgo en los datos a obtener, por lo que fue aplicado el protocolo de bioseguridad utilizado en el laboratorio, con las normas

principales la higiene del personal, ducharse antes del ingreso a la sala de producción, limpieza constante con alcohol al 95% del área de trabajo, uso de equipo de protección: mascarillas, redecillas, guantes de látex, uniforme desinfectado, bata de laboratorio desinfectada, calzado desechable, cristalería desinfectada y flameada.

### C. Desinfección de los sustratos

El proceso de desinfección de los sustratos consistió en 3 diferentes fases:

### D. Fase de Lavado:

Esta fase fue realizada con el fin de eliminar y evitar contaminación posterior Figura 20, la misma constó de 3 lavados con agua potable y posterior remojo en agua con 2.5 litros de solución de cloro al 70% (3%) + Cloranfenicol (50mg/l), por 6 horas antes de la fase de cocción.



*Figura 20. Fase de Remojo con sobrepeso para evitar flote y lavado de los sustratos evaluados*

### E. Fase de Cocción:

Esta fase fue realizada para ablandar la capa externa de los sustratos utilizados, que mejoró las condiciones para la colonización por parte del hongo (Figura 21).



*Figura 21. Proceso de cocción de los sustratos evaluados.*

Dicho proceso fue variable para cada sustrato y depende de la dureza de la capa externa o la resistencia de las proteínas estructurales a desnaturalizarse; como por ejemplo, en maíz quebrado y grano de arroz, el tiempo de cocción es mínimo, como se muestra en la Cuadro 9.

*Cuadro 9. Tiempos de cocción utilizados para los diferentes sustratos evaluados*

Procesos de Cocción utilizados	
Sustrato	Tiempo de Cocción
Maíz Quebrado	3 minutos
Grano de Arroz	3 minutos
Grano de Sorgo	40 minutos
Olote de Maíz	5 minutos

Fuente: (Alvarez & Sivila, 2013)

#### F. Fase de Embolsado:

Se eliminó el exceso de humedad por medio de coladores industriales de metal, rejillas metálicas con ranuras mayores a 30 mesh, para luego colocar los sustratos en bolsas de celofán de 30.5 X 25.5 cm, la cantidad de sustrato colocada corresponde a 1/3 de la capacidad de la bolsa, posteriormente se sellaron con 3 grapas, como se muestra en la Figura 22.



*Figura 22. Fase de remoción de exceso de humedad, pesado y embolsado de los sustratos*

#### G. Fase de Esterilización

Se realizó con el proceso de esterilización húmeda en autoclave con diferentes periodos basado en el tipo de sustrato, según Gamez, Zapata, Oviedo, & barrera (2008), a 20 PSI de presión, modificado a condiciones del laboratorio del ingenio Magdalena, según experiencias de contaminación previas, describiéndose a continuación y mostradas en la Figura 23.

1. Sustrato de granos de arroz: 121 °C por 30 minutos
2. Sustrato de granos quebrados de maíz: 121 °C por 60 minutos
3. Sustrato de granos de sorgo: 121 °C por 30 minutos
4. Sustrato de olote de maíz: 121 °C por 30 minutos



Figura 23. Proceso de esterilización húmeda con autoclave.

#### H. Fase de enfriamiento:

Enfriamiento por media hora para facilitar la manipulación de las bolsas al salir del proceso de esterilización, apiladas uniformemente para liberación de vapor como se muestra en la Figura 24.



Figura 24. Bolsas de celofán con sustrato sólido salidas del proceso de esterilización húmeda

#### I. Inoculación del hongo en sustratos

Se inocularon los sustratos con 16 ml de la solución con *T. harzianum* cepa magdalena ( $2 \times 10^5$  UFC/ml). Para asegurar la homogeneidad del inóculo, en las bolsas se utilizó

Inyector calibrado al volumen requerido y agitador magnético para mantener en suspensión los conidios, como se muestra en la Figura 25.



Figura 25. Equipo utilizado en la inoculación de *T. harzianum*, A. Inyector, B. Agitador magnético

#### J. Desarrollo de micelio

Para un óptimo desarrollo es necesario de aproximadamente 6 días con condiciones homogéneas de luminosidad, temperatura (26 °C) y humedad (70%), posterior a la inoculación de sustratos en las bolsas de celofán, debido al sello de la bolsa el sustrato no deshidrató (ver Figura 26).



Figura 26. Desarrollo del micelio de *Trichoderma* en los sustratos

### K. Desarrollo de estructuras reproductivas

Etapa que expone el micelio de *Trichoderma* a stress por la deshidratación del sustrato, con el uso de deshumidificadores en las salas de secado, lo que provoca la producción de estructuras reproductivas; esta fase se realiza en bandejas de plástico y sin cubierta protectora, como se muestra en la Figura 27.



*Figura 27. Fase de desarrollo de estructuras reproductivas en bandeja de plástico*

### L. Almacenamiento

Con humedad del 15% los sustratos se almacenaron en bolsas de papel manila y llevados hacia el cuarto frío a 2 °C como se muestra en la Figura 28.



*Figura 28. Fase de almacenamiento en las instalaciones del cuarto frío del ingenio Magdalena S.A.*

### 2.5.4. Recolección de datos

#### a. Concentración de conidios por gramo:

Se determinó por medio lecturas en cámara Neubauer como se observa en la Figura 29, se diluyó la muestra de la siguiente manera: de la solución madre concentrada (1:1), se tomó 1 ml de alícuota y se diluyó en 9 ml de agua desmineralizada en tubo de ensayo, a partir de esta solución (1:10) se tomó 0.1 ml y se colocó en la cámara para la lectura de concentración de conidios al microscopio, por medio de conteo de conidios por cuadrante para utilizar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración conidios}}{\text{g de sustrato}} = \frac{\left( \frac{\bar{X} \text{ conteos}}{\text{campo}} \right) \times 10,000 \times \text{Vol. Inicial} \times \text{Dilución 1}}{\text{Peso de sustrato utilizado}}$$



Figura 29. Flujo grama para el conteo de conidios por gramo.

#### b. Periodo para almacenamiento de sustratos

Debido a la distribución masiva de *T. harzianum* dentro de fincas del ingenio Magdalena es necesaria la fase de almacenamiento, la cual busca mantener la calidad y viabilidad del producto fuera del laboratorio, además de evitar contaminación, el factor determinante para el almacenamiento es la humedad del sustrato, la cual no debe sobrepasar el 15% de humedad, normas de calidad del ingenio Magdalena, ya que

valores superiores promueven el desarrollo de organismos oportunistas tales como: *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.* y algunas bacterias, dicho valor fue determinado con balanza higrométrica (ver Figura 34).

c. Tasa de producción de conidios:

Se realizó el análisis de regresión, creado a partir de la densidad de conidios/g, producto de conteos diarios, después de la inoculación. Para observar el comportamiento a lo largo del tiempo y generar el siguiente modelo de regresión para cada sustrato.

$$Y_t = Y_1(1 + r)^t$$

En donde:

$Y_t$  Unidades formadoras en el t-ésimo período

$Y_1$  Unidades formadoras en el período 1

$r$  tasa media de crecimiento por unidad de tiempo

$t$  t-ésimo período

d. Viabilidad de Conidios:

Se determinó la viabilidad de conidios por medio del cultivo de conidios en medio PDA e incubación por 17 horas, posteriormente se contabilizó en microscopio la proporción de conidios viables que han iniciado la formación de micelio, como se muestra en la Figura 30.

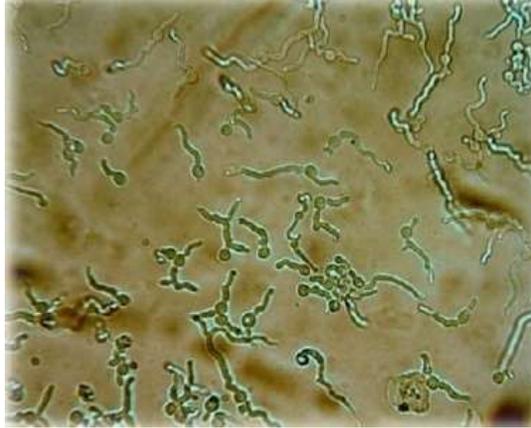


Figura 30. Unidades formadoras de colonias de *Trichoderma* sp. con Inicio de la fase de formación de micelio

Se realizó conteo de viabilidad de conidios de *T. harzianum* en los diferentes sustratos previo al almacenamiento y durante el almacenamiento con frecuencia de 5 días, con el fin de determinar la variación a lo largo del tiempo, dicha prueba fue realizada en condiciones de refrigeración y bajo condiciones ambientales normales, viabilidad mínima aceptable del 80% para formar nueva colonia.

#### M. Viabilidad en almacenamiento:

Se realizó el análisis de regresión, creado a partir de los valores de viabilidad de conidios, obtenidos en almacenamiento por 40 días. Para observar el comportamiento a lo largo del tiempo y generar el siguiente modelo de regresión para cada sustrato.

$$Y_t = Y_1(1 + r)^t$$

En donde:

$Y_t$  Viabilidad en el t-ésimo período

$Y_1$  Viabilidad en el período 1

$r$  tasa media de decrecimiento por unidad de tiempo

$t$  t-ésimo período

## 2.6. Resultados

### 2.6.1. Concentración de conidios por gramo

Se observó crecimiento de micelio rápido y cobertura del medio en 72 horas (color verde claro) en sorgo y arroz, lo cual se ve reflejado en la gráfica de la *Figura 31*, que muestra concentraciones mayores al resto de sustratos, mayor a  $8 \times 10^7$ , existen diferencias significativas en la concentración de conidios en los sustratos evaluados (Cuadro 16), con cuatro grupos estadísticos (Cuadro 17);

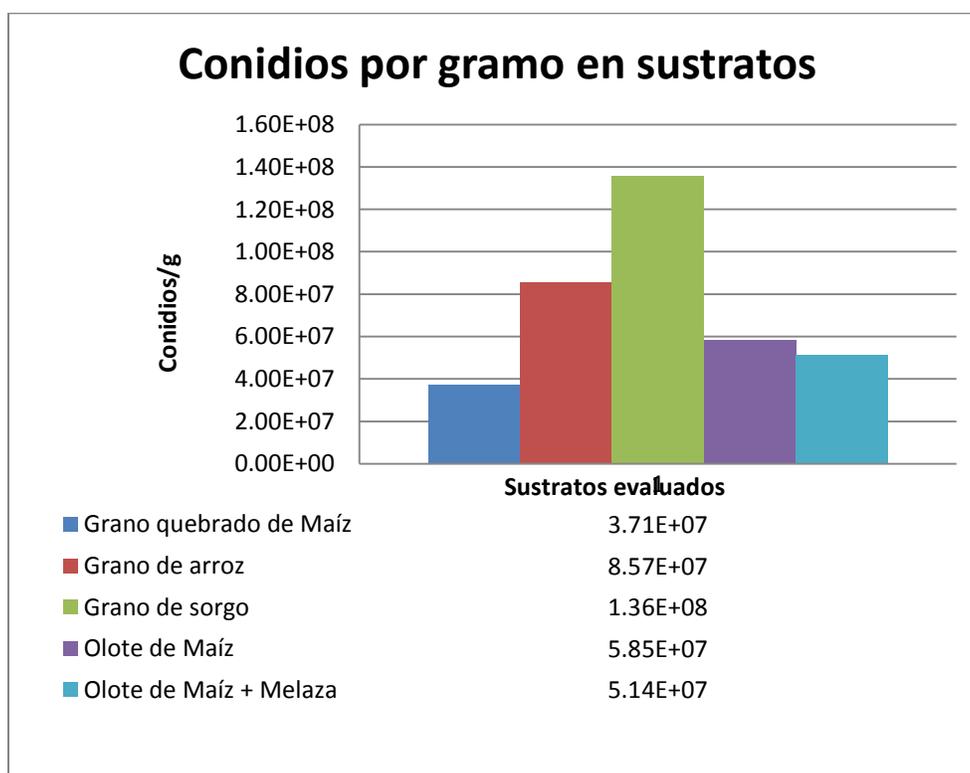


Figura 31. Concentración media de conidios/g en los diferentes sustratos evaluados

El grano de sorgo fue el mejor sustrato en producción de conidios de *T. harzianum* con valores de concentración superiores a  $1.3 \times 10^8$  conidios/g, al igual que lo reportado por (Rini & Sulochana, 2007) y (Benites Bellino & Marroquín, 2013) con rendimientos superiores a  $1.56 \times 10^{10}$  y  $8.3 \times 10^8$  conidios/g respectivamente, a pesar que la producción de conidios de la cepa magdalena es menor, a lo reportado por dichos

autores, se determinó que el proceso de cocción disminuyó significativamente el pericarpio, capa externa del grano, además de aumentar la disponibilidad del material nutritivo al desnaturalizar proteínas esenciales y disminuir la dureza del mismo, por lo que el crecimiento de micelio se incrementó.

Para el sustrato grano quebrado de maíz se obtuvo  $3.71 \times 10^7$  conidios/g, también se utilizó desgaste de la capa externa con la trituración del grano y posterior cocción; al igual que lo citado por (Michel-Aceves, Otero-Sánchez, Martínez-Rojero, Rodríguez-Morán, Ariza-Flores, & Barrios-Ayala, 2008) que concuerdan en que la producción de conidios en el grano quebrado de maíz es la más deficiente,  $0.25 \times 10^8$  conidios/g; en contraste a lo citado por Benites Bellino & Marroquín (2013), que reportan como uno de los mejores sustratos, sin determinar el estado inicial o la fuente de adquisición del grano, además de presentar una cepa distinta, razones para la diferencia en resultados.

Los tratamientos con mejor desarrollo de micelio y mayor producción de conidios, tenían en común: alto contenido de almidón y porcentajes medios de proteína como el caso de grano de sorgo (Cuadro 4) y grano de arroz (Cuadro 3), con la excepción el grano quebrado de maíz, que en comparación a sustratos con niveles bajos de almidón y porcentajes elevados de proteína y fibra como el olote de maíz (Cuadro 5), por lo que la cepa Magdalena necesita balance entre ambos factores, proteína y almidón, para la producción de estructuras reproductivas en contraste a lo citado por Michel-Aceves, Otero-Sánchez, Martínez-Rojero, Rodríguez-Morán, Ariza-Flores, & Barrios-Ayala (2008), el cual reporta al olote de maíz picado como el sustrato con mayor producción de conidios con concentración de  $4.43 \times 10^8$  conidios/g y el grano de sorgo como quinto mejor sustrato con concentración similar con  $1.72 \times 10^8$  conidios/g sin embargo ambos resultados de concentración se reportaron a los 21 días de desarrollo.

### 2.6.2. Tasa de producción de conidios

Se determinó la tasa de producción de conidios por medio de análisis de regresión, en donde el mejor sustrato fue el grano de sorgo. En el cuadro 10, se muestra el resumen para cada sustrato, en donde el coeficiente de determinación, parámetro que indica el grado de exactitud que presenta el modelo de regresión para describir el fenómeno real, de los sustratos se considera como aceptable ya que los valores de  $R^2$  son superiores al 85%, mientras que en los valores de tasa de crecimiento de la concentración de conidios/g diaria se observa que el grano de sorgo, presentó el mayor valor con 0.5418, debido al balance entre contenido de almidón y fibra, condiciones que benefician el crecimiento acelerado de micelio y estructuras reproductivas cuadro 4, esto provoca que el tiempo para almacenamiento será menor, mientras que el sustrato que presentó la tasa de crecimiento más baja fue el grano de maíz con un 0.1908 debido al alto contenido de almidón mas no de fibra.

Cuadro 10. Tasa de crecimiento de concentración de conidios y coeficiente de determinación de modelos de regresión generado para cada sustrato

Sustrato	Coeficiente de determinación $R^2$	Tasa producción UFC/día
Grano de sorgo	0.94090	0.5418
Olote de Maíz	0.898390	0.322
Grano de arroz	0.898510	0.3167
Olote de Maíz + Melaza	0.888247	0.3065
Grano quebrado de Maíz	0.849027	0.1908

### 2.6.3. Periodo para almacenamiento de sustratos

Posteriormente a colocar los sustratos en bandeja para producción de estructuras reproductivas, se determinó el nivel de humedad de los mismos por medio de balanza hidrométrica. Los datos se muestran en el cuadro 11.

La variación del porcentaje de humedad en función del tiempo en bandeja, en donde el sustrato grano de maíz, grano de arroz y grano de sorgo necesitan aproximadamente

10 días para presentar características necesarias para almacenamiento, humedad menor al 15%, mientras que los sustratos olote y olote con la adición de solución de melaza al 10% necesitan aproximadamente 20 días.

Cuadro 11. Porcentaje de humedad de los diferentes sustratos en los diferentes días en bandeja.

Sustrato	Día						
	0	2	4	6	10	15	20
Grano quebrado de Maíz	31.69%	28.61%	26.72%	18.06%	12.00%	9.60%	8.60%
Grano de Arroz	45.63%	34.53%	27.04%	22.34%	11.00%	8.90%	8.15%
Grano de Sorgo	32.77%	25.73%	24.78%	17.24%	15.90%	7.81%	7.70%
Olote de Maíz	65.97%	55.19%	52.11%	51.14%	47.02%	23.40%	12.15%
Olote de Maíz + Melaza	72.51%	63.23%	61.14%	54.73%	50.70%	27.24%	15.16%

Los sustratos de olote y olote con la adición de melaza debido a al alto contenido de fibra provoca que contenga alta capacidad de absorción de humedad y aumento del volumen, son los sustratos que presentaron mayor dificultad para liberar la misma por lo que requieren de mayor tiempo para almacenamiento, propensos a contaminaciones externas.

#### **2.6.4. Viabilidad de conidios**

##### ***A. Viabilidad de conidios en cosecha:***

Se realizaron pruebas de viabilidad de conidios para los diferentes sustratos, proporción de conidios viables, en el cuadro 12 se presentan los resultados obtenidos.

Cuadro 12. Valores de viabilidad de conidios para los diferentes sustratos en cosecha para almacenamiento

Tratamiento	Viabilidad
Grano quebrado de Maíz	98.53%
Grano de Arroz	97.59%
Grano de Sorgo	99.50%
Olote de Maíz	99.01%
Olote de Maíz + Melaza	96.69%

Datos utilizados para realizar análisis de varianza, 95% de confiabilidad, en donde no se detectaron diferencias significativas en la viabilidad de conidios producidos en los diferentes sustratos, al igual que lo reportado por (Benites Bellino & Marroquín, 2013) y (Michel-Aceves, Otero-Sánchez, Martínez-Rojero, Rodríguez-Morán, Ariza-Flores, & Barrios-Ayala, 2008) que no detectaron diferencias significativas en el valor de viabilidad en, sin embargo el Grano de sorgo presentó el mayor valor de la misma 96% y 94.8%, en comparación a la presente investigación que presentó viabilidad mayor con 99.5%.

### ***B. Viabilidad de conidios en almacenamiento:***

Con los datos obtenidos se generaron los modelos de regresión (Cuadro 23A)(cuadro 24A), que expresan la disminución media diaria de viabilidad en cada sustrato en función del tiempo en condiciones ambientales normales y en refrigeración (2 °C) con los siguientes resultados:

Modelos de Regresión:

Refrigeración:  $Y_t = -0.0410(1 + r)^t$

Ambiente:  $Y_t = 0.05(1 + r)^t$

Cuadro 13. Tasa de Pérdida de viabilidad de *T. harzianum* cepa Magdalena

Tasa de pérdida de viabilidad (r)		
Sustrato	Viabilidad en almacenamiento	
	Refrigeración (R <sup>2</sup> = 0.9814)	Ambiente (R <sup>2</sup> = 0.9716)
Grano quebrado de maíz	-0.0033	-0.0172
Grano de arroz	-0.0031	-0.0117
Grano de sorgo	-0.0022	-0.0071
Olote de Maíz	-0.0079	-0.0355
Olote de Maíz + Melaza	-0.0090	-0.0350

Se observa, en el cuadro 13, la tasa de decrecimiento de viabilidad para cada sustrato en condiciones ambientales y de refrigeración, en donde se demuestra que la tasa de decrecimiento para cada sustrato es mayor en condiciones de refrigeración que en condiciones ambientales normales, de igual manera (Ortiz, Fernandez, Galindo, & Serrano, 2009) citan que La temperatura y la deshidratación paulatina del sustrato juegan un papel importante en la preservación de conidios viables en almacenamiento, después de 40 días el grano de sorgo presenta la tasa más baja con -0.0022, lo que indica que existe disminución media de la viabilidad del -0.22% cada día, lo que representa el sustrato con mejores condiciones para mantener latentes los conidios de *T. harzianum* por el alto contenido de almidón, la tasa de decrecimiento más alta se encuentra en el sustrato olote de maíz en condiciones ambientales, esto debido a que la deshidratación del mismo fue excesiva, esto por al alto contenido de fibra, lo que perjudico la sobrevivencia de esporas. En las figuras 31 y 32, se presentan gráficos comparativos de ambas condiciones, a las que fue expuesto *T. harzianum*, en los sustratos evaluados.

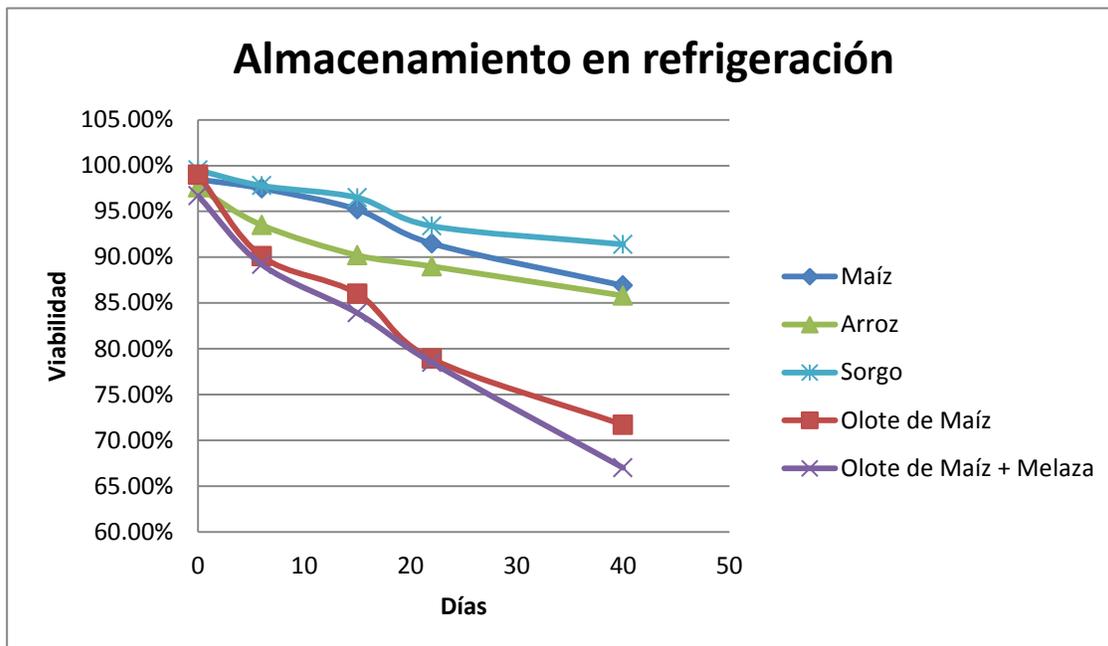


Figura 32. Viabilidad de conidios de *T. harzianum*, en condiciones de refrigeración en los sustratos evaluados.

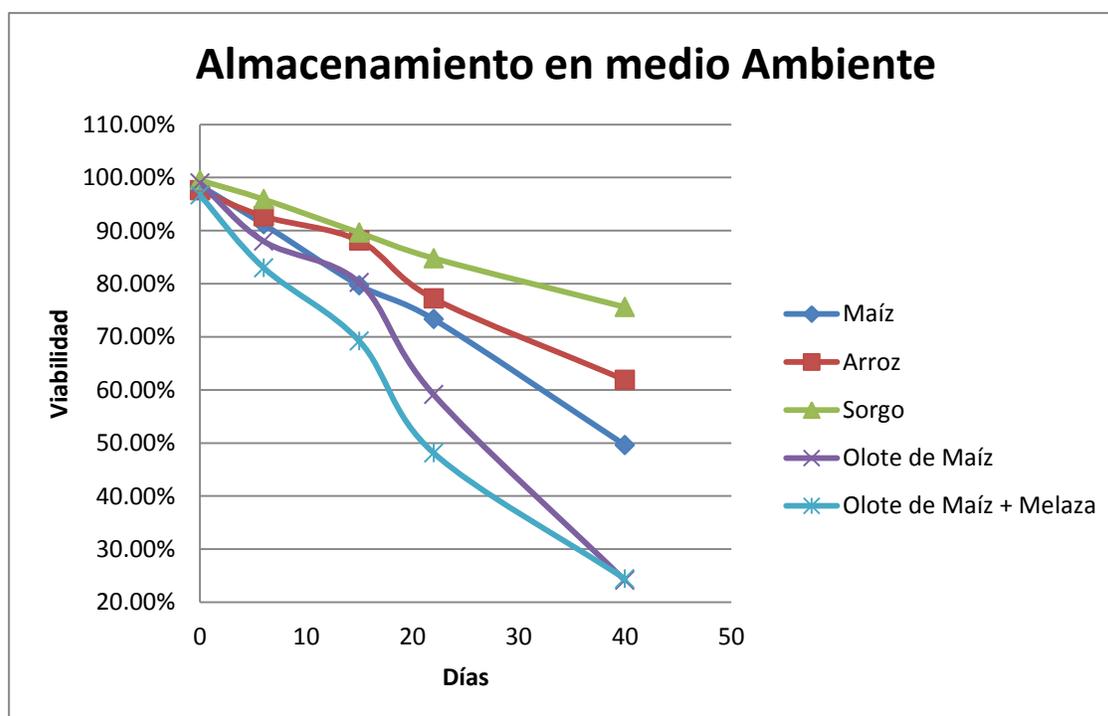


Figura 33. Viabilidad de conidios de *T. harzianum* en condiciones ambientales normales en los sustratos evaluados.

## 2.7. Conclusiones

- 2.7.1. El Grano de sorgo presentó los mayores valores de concentración de conidios/g,  $1.36 \times 10^8$  UFC/g, con viabilidad media de 99.5% por lo que es el sustrato más recomendable para la producción masiva de *T. harzianum*.
- 2.7.2. La mayor tasa crecimiento en producción de conidios/g en fase de bandeja fue el Grano de sorgo el cual presentó un valor de 0.5418.
- 2.7.3. Con base en el porcentaje de humedad requerido, menor al 15%, el grano de arroz requiere menos de 10 días, por lo que el periodo para almacenamiento es el menor y más eficiente.
- 2.7.4. El Grano de sorgo presentó mayor viabilidad al final del periodo de estudio en refrigeración con 91.4% de viabilidad, con la menor tasa de decrecimiento de viabilidad con -0.22%, por lo que recomendada dicha condición para el almacenamiento del sustrato.

## 2.8. Recomendaciones

- 2.8.1. Durante el proceso de producción de estructuras reproductivas en bandeja es necesario mantener cierta cubierta protectora en la deshidratación del sustrato en los primeros 3 días esto con el fin de propiciar mayor desarrollo de micelio, lo que provocara mayor desarrollo de estructuras reproductivas.
- 2.8.2. Se recomienda utilizar el Grano de sorgo en la producción de *T. harzianum* debido a que presentó las mejores características en producción de laboratorio del hongo.
- 2.8.3. En época de escasez de Granos de sorgo se recomienda utilizar el Grano de arroz como sustrato alterno ya que presento características deseables para la producción de *T. harzianum* en laboratorio.

## 2.9. Referencias

- 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.
- Benites Bellino, C. M., & Marroquín, L. C. (2013). Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Portal de la Ciencia*, 4, 68-74.
- Benítez, C. G., & Pfeiffer, H. (2006). *El maíz: origen, composición química y morfología*. México: UNAM, Instituto de Investigaciones en Materiales.
- Bisset, J. (1991). A revision of genus *Trichoderma* sp., Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, IV, 69.
- Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma* spp., infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2357-2372.
- Calderon, J. (2009). *Determinación de la mejor etapa de aplicación de la fertilización nitrogenada en el sustrato caña de maíz (Zea mays L.) para la producción del hongo Pleurotus ostreatus (Jacq.) Kumm (Cepa ECS-152) (Tesis Ing. Agr.)*. Guatemala: USAC, Facultad de Agronomía.
- Calvacante, R., Lima, H., Pinto, G., Gava, C., & Rodríguez, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma conidia* production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol*, 1, 100-104.
- Chávez-García, M., Montaña-Lara, J. S., Martínez-Salgado, M. M., Mercado-Reyes, M., & Rodríguez, M. X. (2009). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251.
- Del Cid, J. (2011). Localización de fincas Ingenio Magdalena (correo electrónico). Escuintla, Guatemala, Ingenio Magdalena, SIG.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2014). InfoStat version 2014. US. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>
- Domanski, C., Giorda, L. M., & Feresin, O. (1997). *Composición y calidad del grano de sorgo*. Recuperado el 22 de set de 2015, de Manfredi, Argentina, EEA, INTA. Cuaderno de Actualización no. 7, 47-50.: [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/suplementacion/42-calidad\\_y\\_composicion\\_del\\_grano\\_de\\_sorgo.htm](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/42-calidad_y_composicion_del_grano_de_sorgo.htm)
- Fajardo, E., & Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae. (Tesis Lic. Microbiol. Industrial)*. Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

- FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernandez-Larrea, V. O. (2004). *Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad*. La Habana, Cuba, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad.
- Gamez, E., Zapata, R., Oviedo, 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.
- García, R., Salas, J., & Riera, R. (2005). Uso del antagonista *Trichoderma harzianum* para controlar tres enfermedades fungosas de suelo. *INIA Divulga* , 8-14.
- Gomez Pereira, P. (2006). *Trabajo de graduación realizado en ingenio pantaleón, Siquinalá, Escuintla. (Tesis Ing. Agr.)*. Guatemala: USAC, Facultad de Agronomía.
- 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). US: The American Phytopathological Society.
- Holt, J. R., & Ludica, C. A. (2013). *Fungi*. Recuperado el 07 de Febrero de 2014, de Diversity of Life: <http://comenius.susqu.edu/biol/202/Taxa.htm>
- Kruger, T., & Bacchi, L. (1995). *Manual de fitopatología* (3 ed.). Sao Paulo, Brasil, Brasil: Agronomica Ceres.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., & Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* and their telemorphs. En C. P. Kubicek, & G. E. Harman, *Trichoderma and Gliocladium; basic biology, taxonomy and genetics* (Vol. 116, págs. 1-56). Londres, Inglaterra: Taylor & Francis.
- Martin, J. P., Abbott, E. V., & Hughes, C. V. (1961). *Sugarcane disease of the world* (Vol. I). Nueva York, US: Elsevier Publishing.
- Michel, A. (2001). *Cepas nativas de Trichoderma sp. Euascomycetos, su antibiosis y micoparasitismo sobre Fusarium subglutinans y F. oxysporum (Hyphomycetes:Hyphales)*. (Tesis PhD. Biotecnología). Colima, México, México: Universidad de Colima.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* , 14(2), 185-191.
- Naar, Z., & Kecskés, M. (1995). A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. *Microbiol Res.* , 150(3), 239-246.

Ortiz, M., Fernandez, M., Galindo, E., & Serrano, L. (2009). Estudio de la deshidratación y del tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad estructural de esporas de *Trichoderma harzianum*. *XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Acapulco, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis.

Persoon, C. (1801). *Synopsis methodica fungorum*. Gottingen, Alemania: Apvd Henricvm Dieterich.

Pincirolí, M., Martínez, E., & Vidal, A. (2010). *Proteínas del arroz: propiedades estructurales y funcionales. (Tesis MSc. Tecnol. e Higiene de los Alimentos)*. La Plata, Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

Pomeranz, Y., & Ory, R. (1982). Rice processing and utilization. En I. A. Wolf, *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture* (págs. v. 2, 139-186). West Palm Beach, Florida, US: CRC Press.

Rajput, A. Q., Khanzada, M. A., & Shahzad, S. (2014). Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Agriculture, Science and Technology* , 16, 16, 731-745.

Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* , 116, 1-56.

Rini, C., & Sulochana, K. (2007). Substrate evaluation for multiplication of *Trichoderma* spp. *Journal of Tropical Agriculture* , 45(1-2), 58–60.

Samuels, G. (1996). *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus*. *Mycological Research* , 100(8), 923-935.

Sivan, A., & Chet, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopatology* , 79(2), 198-203.

Sivila, N., & Alvarez, S. (2013). *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar: producción artesanal de Trichoderma*. San Salvador de Jujuy, Argentina, Argentina: Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias, Universitaria de Jujuy.

Stefanova, N. (1997). Control de enfermedades fúngicas del suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*. *Curso internacional de sanidad vegetal* (págs. 1-8). La Habana, Cuba: MINAG.

Stefanova, N. M., & Sandoval, R. I. (1995). Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* sp. en el control de fitopatógenos de suelo. *Boletín Técnico CIV INISAV* , no. 2, 10-22.

Tellez, D. (2004). *Caracterización de las melazas empleadas en el proceso de fermentativo de la destilería San-Martín-Industria de Licores del Valle. (Tesis Lic. Bacteriología)*. Cali, Colombia: Universidad del Valle.

Tronsmo, & Harman. (1992). *Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by Trichoderma harzianum on media containing chitin* (Vol. II). Biological control.

Tronsmo, A., & Harman, G. E. (1992). Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on media containing chitin. *Biological Control*, 4(2), 272-277.

Ullua, M., & Herrera, T. (1994). *Etimología e iconografía de géneros de hongos*. México: UNAM, Instituto de Biología.

Victoria, J. I., Guzmán, M. L., & Angel, J. C. (1995). Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. En C. Cassalet D., J. Torres A., & C. Isaacs E., *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia* (págs. 265-293). Cali, Colombia: CENICAÑA.

Villegas, E. (2000). *Identificación de aislamientos promisorios de Trichoderma spp. para el manejo de la pudrición de la corona y raíz del manzano ( Malus domestica , Borkh)*. Manizales, Colombia, Caldas, Colombia: Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Fitotecnia.

Watson, S. (1987). Structure and composition. En P. J. White, & L. A. Johnson, *Corn: chemistry and technology* (págs. 53-82). St. Paul, EE.UU.: Amer Assn of Cereal Chemists.

## 2.10. Anexos

Cuadro 14A Productos comerciales a base de *Trichoderma* para control biológico de enfermedades en plantas

Organismo de biocontrol	Producto (país de registro)	Patógeno/enfermedad/Cultivo
<i>Trichoderma spp.</i>	Promot (US), Anti fungus, Biofungus TY, Trichoderma 2000	<i>Verticillium, Rhizoctonia, Fusarium, Sclerotium, Sclerotinia, Phytophthora</i> / Hongos de suelo/ en frutos, vegetales
<i>T. lignorum</i> (Tode)	Trichodermin-3 (Rusia-Bulgaria)	<i>Fusarium</i> y enfermedades de raíz
<i>T. viride</i>	Trichodowels, Tricho, Trichojet (NZ)	<i>Chondrosterum purpureum</i> y otros hongos / árboles frutales
<i>T. harzianum</i>	Suprevisit (Czech Rep.), Trichopel, Bio-Trek, T-22G, T-35, F-Stop, Rootshield	<i>Pythium ultimum, Rhizoctonia, Fusarium, Sclerotium, Sclerotinia</i> /Patógenos del suelo
<i>T. harzianum</i>	Trichodex 25WP	<i>Botrytis cinérea</i>
<i>T. harzianum</i> y <i>T. polysporum</i>	Binab T (Sweden, UK)	<i>B. cinérea</i> / frutos
<i>T. virens</i>	SoilGard 12G (US)	<i>P. ultimum, Rhizoctonia solani</i>

Fuente: (Michel, Cepas nativas de *Trichoderma* sp. Euascomycetos, su antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (HYPHOMYCETES:HYPHALES), Tesis Doctoral en biotecnología , 2001)

Cuadro 15<sup>a</sup> Valores de producción de conidios en los diferentes sustratos evaluados, 10 días en bandeja

Concentración de conidios/g					
Repetición	Grano quebrado de Maíz	Grano de arroz	Grano de sorgo	Olote de Maíz	Olote de Maíz + Melaza
1	3.92E+07	8.98E+07	1.35E+08	6.86E+07	5.42E+07
2	3.18E+07	8.88E+07	1.37E+08	5.57E+07	5.28E+07
3	3.80E+07	8.00E+07	1.35E+08	5.64E+07	5.30E+07
4	3.96E+07	8.43E+07	1.36E+08	5.33E+07	4.57E+07
<b>Media</b>	<b>3.71E+07</b>	<b>8.57E+07</b>	<b>1.36E+08</b>	<b>5.85E+07</b>	<b>5.14E+07</b>

Cuadro 16A Resultados del análisis de varianza para la comparación del rendimiento de UFC/g entre sustratos

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
UFC/g	20	0.99	0.99	5.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24188062275947100.00	4	6047015568986780.00	313.53	<0.0001
Sustrato	24188062275947100.00	4	6047015568986780.00	313.53	<0.0001
Error	289299491209455.00	15	19286632747297.00		
Total	24477361767156600.00	19			

Cuadro 17A Resultados del análisis de comparación de medias con la metodología de TUCKEY con 5% de significancia

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=9589144.84719

Error: 19286632747296.9961 gl: 15

Sustrato	Medias	n	E.E.	
Grano de sorgo	135648951.96	4	2195827.45	A
Grano de arroz	85713132.57	4	2195827.45	B
Olote de Maíz	58501239.36	4	2195827.45	C
Olote de Maíz + Melaza	51413099.64	4	2195827.45	C
Grano quebrado de Maíz	37130599.64	4	2195827.45	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Cuadro 18A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato grano quebrado de maíz

Análisis de varianza modelo de regresión grano quebrado de maíz

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	6.75039831	6.75039831	123.721012	1.68296E-10
Residuos	22	1.20035199	0.05456145		
Total	23	7.95075031			

Análisis de los coeficientes obtenidos para sustrato grano quebrado de maíz

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	15.8209253	0.1009415	156.7336	4.952E-35
Días	0.17463902	0.01570072	11.1229947	1.683E-10

*Cuadro 19A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato grano de arroz*

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	16.7580095	16.7580095	194.77054	2.07806E-12
Residuos	22	1.8928746	0.08603975		
Total	23	18.6508841			

*Análisis de los coeficientes obtenidos para sustrato grano de arroz*

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	15.7736065	0.12675829	124.438457	7.8876E-33
Días	0.27516159	0.01971633	13.9560216	2.0781E-12

*Cuadro 20A. Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato grano de sorgo*

*Análisis de varianza modelo de regresión grano de sorgo*

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	41.4844842	41.4844842	350.25056	5.3132E-15
Residuos	22	2.60573074	0.11844231		
Total	23	44.0902149			

*Análisis de los coeficientes obtenidos para sustrato grano de sorgo*

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	14.9486462	0.14872372	100.51286	8.5824E-31
Días	0.43293175	0.0231329	18.7149822	5.3132E-15

*Cuadro 21A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato olote de maíz*

<i>Análisis de varianza modelo de regresión sustrato olote de maíz</i>					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	17.2692484	17.2692484	194.515434	2.1053E-12
Residuos	22	1.95317903	0.08878086		
Total	23	19.2224274			

<i>Análisis de los coeficientes obtenidos para sustrato olote de maíz</i>				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	15.3740323	0.12876164	119.399168	1.9559E-32
Días	0.27932725	0.02002794	13.946879	2.1053E-12

*Cuadro 22A Resultados del análisis de varianza para la determinación del modelo de regresión del sustrato olote de maíz con melaza*

<i>Análisis de varianza modelo de regresión sustrato olote de maíz con melaza</i>					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	15.8175421	15.8175421	174.863309	6.0272E-12
Residuos	22	1.99004541	0.09045661		
Total	23	17.8075875			

<i>Análisis de los coeficientes obtenidos para sustrato olote de maíz con melaza</i>				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	15.3822561	0.12997115	118.351313	2.3738E-32
Días	0.26732901	0.02021607	13.2235891	6.0272E-12

Cuadro 23A Viabilidad de esporas de *T. harzianum* en condiciones de refrigeración y en condiciones ambientales por 40 días

Sobrevivencia Esporas de Trichoderma						
Días		Viabilidad				
		0	6	15	22	40
Grano quebrado de maíz	Refrigeración	98.5%	97.5%	95.2%	91.5%	86.9%
	Ambiente	98.5%	91.2%	79.7%	73.3%	49.6%
Grano de arroz	Refrigeración	97.6%	93.5%	90.2%	89.0%	85.8%
	Ambiente	97.6%	92.7%	88.1%	77.2%	61.9%
Grano de sorgo	Refrigeración	99.5%	97.8%	96.5%	93.4%	91.4%
	Ambiente	99.5%	95.9%	89.6%	84.8%	75.6%
Olote de Maíz	Refrigeración	99.0%	90.1%	86.0%	78.9%	71.7%
	Ambiente	99.0%	88.0%	80.2%	59.1%	24.1%
Olote de Maíz + Melaza	Refrigeración	96.7%	89.2%	83.9%	78.5%	67.0%
	Ambiente	96.7%	83.0%	69.2%	48.1%	24.4%

Cuadro 24A Análisis de varianza para el modelo de regresión de viabilidad de conidios en refrigeración durante su almacenamiento

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.99066189
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.98141098
Error típico	0.01753217

Análisis de varianza

	G.L.	S.C.	C.M.	F	Valor crítico de F
Regresión	9	0.24342042	0.02704671	87.9919771	2.4133E-11
Residuos	15	0.00461066	0.00030738		
Total	24	0.24803107			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	-0.04097879	0.01242097	-3.29916263	0.00486726
Días (X <sub>1</sub> )	-0.00906007	0.00057342	-15.7999276	9.3026E-11

**Cuadro 25A** *Análisis de varianza para el modelo de regresión de viabilidad de conidios durante su almacenamiento en condiciones ambientales normales*

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.98568426
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.97157347
Error típico	0.08284994

**Análisis de varianza**

	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	9	3.51906574	0.3910073	56.9640045	5.65786E-10
Residuos	15	0.10296168	0.00686411		
Total	24	3.62202742			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	0.05282384	0.05869645	0.89994951	0.38236815
Días (X <sub>1</sub> )	-0.03565059	0.00270977	-13.1563055	1.2176E-09



**Figura 34A** *Balanza hidrométrica utilizada para la determinación del nivel de humedad de sustrato*

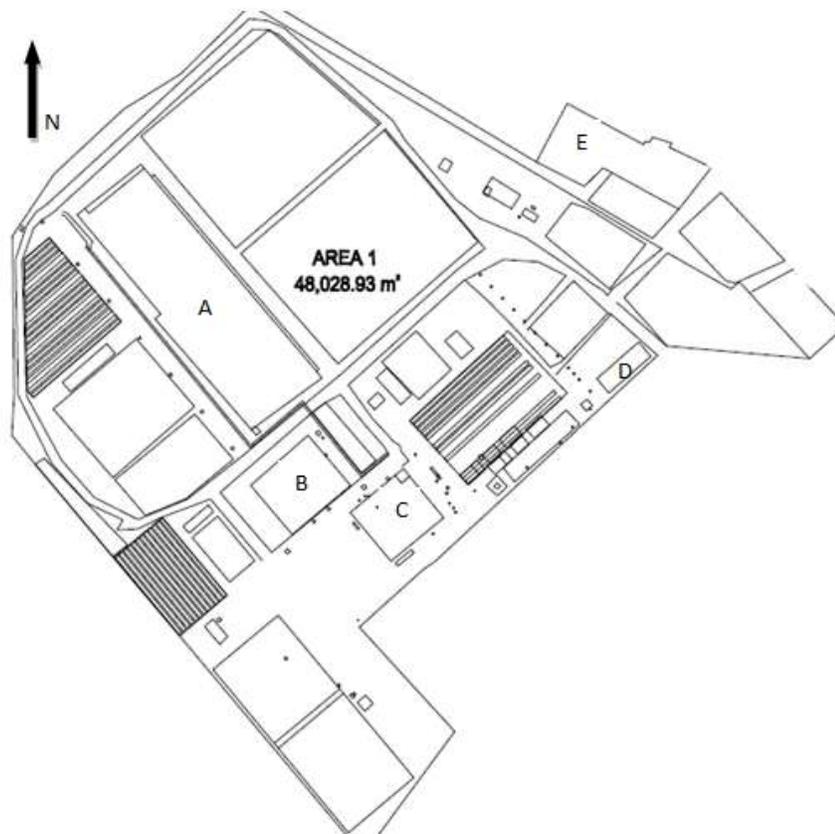


Figura 35A. Áreas funcionales de importancia del departamento de biotecnología Magdalena. A. Invernaderos de Aclimatación de plantas *in-vitro*. B. Laboratorio de micro propagación. C. Laboratorio de producción de entomopatógenos. D. Bodega general. E. Planta de manejo de desechos



### **CAPITULO III**

SERVICIOS REALIZADOS EN ÁREA DE INVESTIGACIÓN EN CONTROL DE PLAGAS Y MICROORGANISMOS DEL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA – BIOMAG-, DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA ESCUINTLA, GUATEMALA. C.A



### 3.1. Presentación

Según (CENGICAÑA, 2013), la caña de azúcar es de los cultivos relevantes en la economía nacional. Prueba de ello es que, en los últimos años, el área sembrada se ha extendido considerablemente: en la zafra 1990-1991 fue de 119,000 ha; en la de 1998-1999, 180,000 Ha y en el 2002 fue de 187,000 ha, lo que representa crecimiento de 66.7% en doce años, el área cultivada para el año 2014 fue de 235,000 Ha, lo que representa el 2.15% del territorio nacional.

Según (ASAZGUA, 2015) El azúcar representa el 15.35% de las exportaciones totales del país; el 3% del PIB y 31.6% del total de exportaciones agrícolas del país. A la vez, origina alrededor de 425,000 empleos directos e indirectos, con ingresos superiores al promedio de las actividades agrícolas. Guatemala produce el 51% del total de azúcar en Centroamérica, asimismo consume el 48% de la producción, que es el porcentaje más bajo en Centroamérica, y es el cuarto exportador mundial y segundo en Latinoamérica. En el período 2013/2014, Guatemala exportó 1, 437,796 quintales de azúcar con total de \$ 910 millones generados por divisas al exportar.

### 3.2. Residualidad de cristales de *Bacillus thuringiensis*, con diferentes soluciones coadyuvantes para el control de gusano barrenador del tallo *Diatrea crambidoides*

#### 3.2.1. Objetivos

##### A. General:

Ampliar el periodo control para gusano barrenador de la caña de azúcar *Diatrea crambidoides* en el ingenio magdalena.

##### B. Especifico:

- Determinar la residualidad de Dipel® WG a base de *Bacillus Thuringiensis* var. kurstaki con diferentes coadyuvantes para el control del barrenador del tallo *Diatrea crambidoides*.
- Determinar la residualidad de Coragen® 20 SC y Condor® 7.2 OF (*Bacillus Thuringiensis* var. Kustaki cepa EG 2348) en el control de gusano barrenador del tallo de la caña de azúcar *Diatrea crambidoides*.
- Determinar el porcentaje de mortalidad de gusano barrenador *Diatrea crambidoides*.

### 3.2.2. Metodología

#### A. Descripción de la investigación:

El producto comercial Dipel® 6.4 WG a base de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* contiene residualidad baja ya que por las condiciones climáticas, especialmente radiación solar, la estructuras reproductivas del hongo no presentan sobrevivencia aceptable por lo que es necesario realizar aplicaciones consecutivas en campo para observar resultados aceptables en el control del gusano barrenador del tallo.

#### B. Diseño experimental

El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio, por lo que la única fuente de variación, con efecto esperado sobre la variable respuesta son los tratamientos ensayados. Por esta razón, el diseño experimental utilizado fue el diseño completamente al azar, donde fueron evaluados 8 tratamientos y 4 repeticiones.

El modelo matemático para dicho diseño experimental es el siguiente:

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

Donde:

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

$\mu$  = Media general de la variable respuesta

$\tau_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento en la variable respuesta

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental

#### C. Descripción de los tratamientos

Con el fin de determinar el incremento en la residualidad de Dipel® WG por la adición de diferentes adyuvantes Cuadro 26, se utilizó la siguiente metodología:

Se realizó la mezcla de 1 litro de solución con cada producto en las siguientes dosis:

Cuadro 26: Listado de Productos comerciales y coadyuvantes a utilizados

Tratamiento	Producto	Dosis
T1	Coragen® 20 SC	100 cc/ha
T2	Dipel® WG	600 g/ha
T3	+ Carbón Activado	1 kg/ha
T4	+ Melaza	4 lt/ha
T5	+ levadura de cerveza	4 kg/ha
T6	+ Aceite Vegetal	4 lt/ha
T7	Condor® 7.2 OF	1 Lt/ha

#### D. Descripción de la unidad experimental

La unidad experimental utilizada constó de 1 caja Petri de vidrio en la cual se colocaron 5 larvas de barrenador de la caña *Diatraea crambidoides*, a cada una le fue administrado 4 porciones de hoja con el tratamiento evaluado, y 40 gramos de dieta energética.

#### E. Arreglo espacial de la investigación

T1	T4	T2	T3	T4	T3	T6	T1
T2	T6	T8	T5	T6	T1	T8	T4
T5	T8	T7	T7	T2	T7	T5	T7
T3	T1	T3	T5	T4	T6	T8	T2

Figura 36: Croquis de la distribución de las unidades experimentales aleatorizadas

## F. Variables respuesta

- Mortalidad:

Proporción de larvas de *D. crambidoides* que mueren por efecto de los tratamientos evaluados.

- Residualidad efectiva en el tejido vegetal:

Periodo de tiempo en el cual existe mortalidad de larvas de *D. crambidoides* por ingesta de material vegetal con los tratamientos evaluados.

### **3.2.3. Manejo del Experimento**

#### A. Preparación de Tratamientos:

Se tomaron Erlenmeyer plásticos con capacidad de 1 litro en los cuales se realizaron las mezclas de trabajo con volumen proyectado de 200 Lt/ ha, (Cuadro 27) (Figura 37).

Cuadro 27: Productos comerciales y mezclas coadyuvantes evaluados

Tratamientos evaluados			
No.	Tratamiento	Dosis/ha	Dosis/ L
1	Coragen ®	100 ml/ha	0.5 ml/ L
2	Dipel 6,4 WG ®	600 g/ha	3 g/ L
	Carbón activado	1 kg/ ha	5 g/ L
3	Dipel 6,4 WG ®	600 g/ha	3 g/ L
	Levadura	4 kg/ ha	20 g/ L
4	Dipel 6,4 WG ®	600 g/ha	3 g/ L
	Melaza	4 lt/ ha	20 mL/ L
5	Dipel 6,4 WG ®	600 g/ha	3 g/ L
	Aceite Vegetal	4 lt/ ha	20 mL/ L
6	Dipel 6,4 WG ®	600 g/ha	3 g/ L
7	Condor 7.2 OF®	0.5 L/ ha	2.5 mL/ L
8	Testigo	-	-



Figura 37: Soluciones madre utilizadas para la aplicación posterior

### B. Aplicación de Tratamientos:

Para la aplicación de los tratamientos se utilizaron plantas de caña de azúcar variedad CP 72-2086 en fase de pilón durante el periodo de aclimatación (Figura 38), cada

bandeja consta de 22 plantas de 4 meses de edad, fue utilizado atomizador, y fue aplicado 0.2 litros de solución sobre las hojas.



Figura 38: Atomizador utilizado para la aplicación de los tratamientos

#### C. Riego:

Se realizaron riegos constantes para mantener el sustrato a capacidad de campo con lámina aproximada de 1 mm, con frecuencia de 2 días, realizados con manguera para no lavar el producto presente en las hojas.

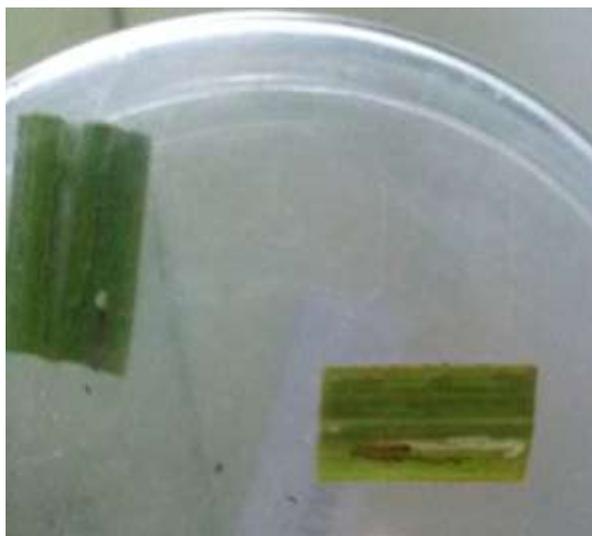
#### D. Manipulación de las larvas de *Diatraea crambidoides*:

Se lavaron y desinfectaron cajas petrí las cuales contendrían las larvas de barrenador de la caña, Se colocaron 5 larvas por caja petrí de 5 días de edad, A las cuales se les administró porciones de hoja de caña de azúcar con el producto aplicado de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> como alimento por 24 horas para asegurar el ingreso de los productos al metabolismo de las larvas (ver Figura 39).



Figura 39: Lavado y desinfección de cajas petrí

Posterior a las 24 horas, se retiraron las porciones de caña de azúcar y se administró dieta de crecimiento de larva, realizada a base de germen de trigo, levadura de cerveza y Agar (Lastra & Gómez, 2006) (ver Figura 40).



*Figura 40: Alimentación de la larva con hojas de caña de azúcar con los productos evaluados*

Se tomaron lecturas de porcentaje de mortalidad al cuarto día después del cambio de alimentación a dieta, al notar el aspecto necrosado y falta de movilidad de las larvas, fue considerada como muerta.

En las semanas próximas se realizó el mismo proceso de colocación de larvas en caja petrí y la incorporación de hojas con producto activo y lectura a los 5 días posteriores, hasta observarse mortalidad generalizada del 0% en todos los tratamientos.

## E. Recolección de Datos

- Mortalidad:

El aspecto necrosado, consistencia rígida y la falta de movilidad definen el estado de mortalidad de la larva (ver Figura 41), por lo que se contabilizaron las larvas muertas para determinar el porcentaje de mortalidad semanalmente.



*Figura 41: Comparación de la condición de la larva de barrenador en la evaluación*

- Residualidad efectiva en el tejido vegetal:

La residualidad del producto en el tejido vegetal se determinó por medio de muestreos semanales, con el periodo de tiempo en que la mortalidad de las larvas es superior a 0%.

### 3.2.4. Resultados

Los productos se aplicaron el día 7 de octubre de 2014, Los porcentajes de mortalidad obtenidos para los diferentes tratamientos, ver Cuadro 28.

Cuadro 28: Porcentaje mortalidad media en función del tiempo con los diferentes tratamientos.

Porcentaje de mortalidad								
Días	Coragen®	Dipel® + Carbón activado	Dipel® + Levadura cerveza	Dipel® + Melaza	Dipel® + Aceite vegetal	Dipel®	Condor®	Testigo
0	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
6	100.00%	100.00%	80.00%	95.00%	100.00%	100.00%	35.00%	0.00%
13	100.00%	95.00%	31.25%	36.25%	27.50%	21.25%	25.00%	0.00%
20	85.00%	40.00%	5.00%	5.00%	5.00%	5.00%	0.00%	0.00%
27	75.00%	25.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.00%	0.00%

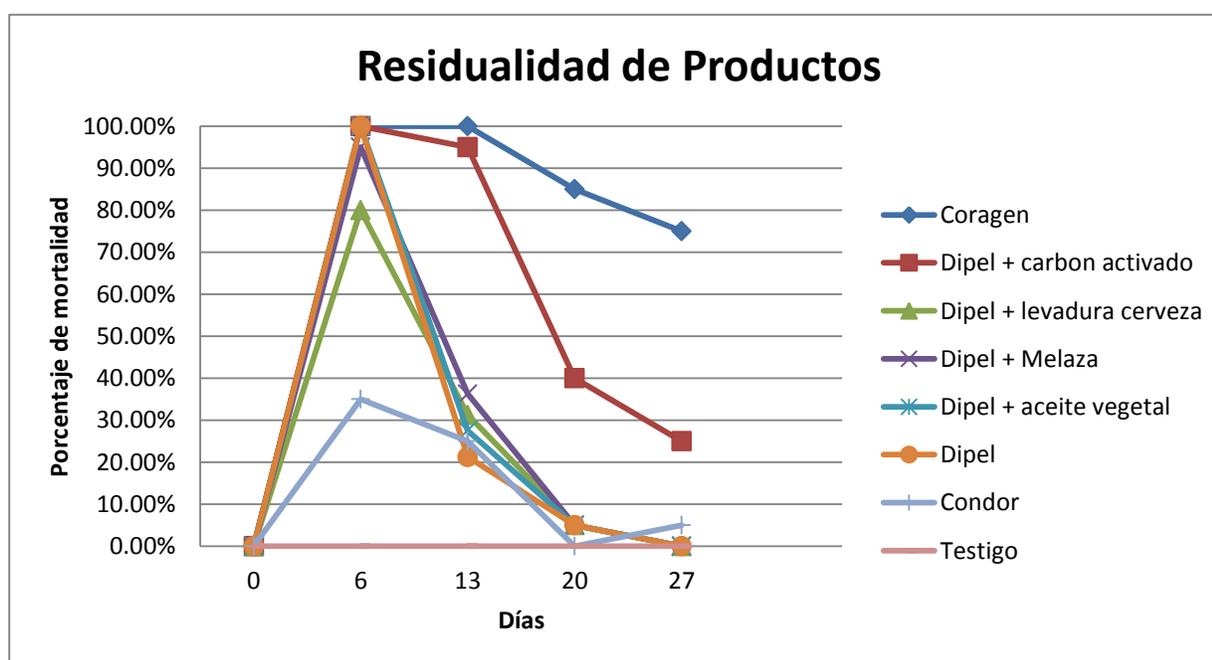


Figura 42: Mortalidad de larvas de barrenador *Diatraea crambidoides* con diferentes productos y coadyuvantes

Como se observa en la Figura 42 la residualidad de los productos evaluados fue elevada hasta el día 13, aproximadamente, sin embargo únicamente el producto químico Coragen® 20 SC y el producto biológico Dipel® WG con Carbón activado como coadyuvante lograron mantener la mortalidad superior al 25% hasta el día 27

considerándose entonces como los productos con mayor residualidad, a pesar que el valor de la misma disminuyo considerablemente.

Por lo tanto el carbón activado y la melaza son considerados como los mejores aditivos para incrementar la residualidad de Dipel® WG esto debido a que forman agregados solubles con las estructuras de *Bacillus Thuringiensis* presentes en el producto, además de proporcionar nutrientes que ayudan a incrementar la sobrevivencia de estructuras reproductivas de dicho organismo en el ambiente.

En comparación a lo reportado por (De Luna , Rojas, Alemán , Arévalo, & Morales, 2001) que reportan a la mezcla de melaza en la dieta y aplicación como gran base fagoestimulante, lo que provoca que la mortalidad incremente y por ende la residualidad.

### 3.2.5. Conclusiones

- Se determinó que la residualidad de Dipel® WG en condiciones controladas es de aproximadamente 27 días, sin embargo de los coadyuvantes analizados el Carbón activado fue el que mejor residualidad presentó con 25% de mortalidad a los 27 días.
- Se evaluaron además de Dipel® WG los productos Coragen® 20 SC (químico) y Condor® 7.2 OF (*Bacillus Thuringiensis* var. Kustaki cepa EG 2348), con el primero con mejor residualidad con 80% de mortalidad al día 27 después de aplicación, mientras que el segundo presentó valores menores de mortalidad y residualidad que en comparación a Dipel® WG

### 3.2.6. Recomendaciones

- Se considera necesaria la replicación de dicha investigación para la validación de los datos obtenidos y la realización de aplicaciones controladas en campo definitivo, sin embargo esta investigación enfoca como grandes candidatos a los aditivos carbón activado y melaza para el aumento de la sobrevivencia de los cristales de *Bacillus Thuringiensis* en condiciones ambientales.

### 3.2.7. Evaluación

#### A. Aspectos positivos

- Condiciones ambientales controladas para la crianza de Larvas de *Diatraea Crambidoides*.
- Disponibilidad de material de laboratorio y biológico (*Bacillus Thuringiensis*, *Diatraea Crambidoides* y pilones de caña de azúcar var. CP 72-2086)
- Bajo costo de establecimiento de investigación en un periodo corto de realización.

#### B. Aspectos negativos

- Falta de espacio específico para la colocación de las bandejas con larvas y dieta alimenticia.
- Producción de larvas de *Diatraea Crambidoides* en instalaciones ajenas al ingenio magdalena.

**3.3. Evaluación del rendimiento de unidades formadoras de colonias – UFC- y calidad de antagonismo de diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* en el Departamento de Biotecnología, Ingenio Magdalena.**

**3.4.1. Objetivos**

**A. General**

Evaluar la el potencial de variabilidad genética de la especie *Trichoderma harzianum* en los suelos de la costa sur guatemalteca, utilizados para el cultivo de caña de azúcar.

**B. Específicos**

- Determinar la producción de unidades formadoras de colonias -UFC- de 21 diferentes cepas de *Tricoderma harzianum*.
- Realizar el análisis de la calidad de antagonismo individual de las cepas analizadas con el fitopatógeno *Cephalosporium sacchari*.

**3.4.2. Metodología**

**A. Descripción de la investigación**

**a. Diseño experimental**

El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio, por lo que la única fuente de variación, con efecto esperado sobre la variable respuesta son los tratamientos ensayados. Por esta razón, el diseño experimental utilizado fue diseño completamente al azar.

El modelo matemático para dicho diseño experimental es el siguiente:

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

Donde:

- $Y_{ij}$  = variable respuesta de la ij-ésima unidad experimental
- $\mu$  = Media general de la variable respuesta
- $T_i$  = efecto del i-ésimo tratamiento en la variable respuesta
- $E_{ij}$  = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

b. Descripción de los tratamientos

Para evaluar las características productivas y calidad de las diferentes cepas del hongo *T. harzianum* se utilizará capa cepa como tratamiento individual, con total de 21 tratamientos, ver Figura 29.

CGM 14-08	CG 14 -16	
CGM 14-07	CG 14 -15	
CG 14-06	CG 14 -14	
CG 14-05	CGL 14 -13	MAGDALENA
CGM 14-04	CG 14 -12	CG 14 -20
CGC 14-03	CGL 14 -11	CG 14 -19
CG 14-02	CG 14 -10	CG 14 -18
CG 14-01	CGC 14 -09	CG 14 -17

Cuadro 29: Cepas de *Trichoderma harzianum* evaluadas

c. Descripción de la unidad experimental:

Se contó con 3 repeticiones o lotes por tratamiento, cada unidad experimental consta de 20 bolsas de producción resistentes al proceso de desinfección húmeda con medidas de 30.5 cm de alto y 25.5 cm de ancho con capacidad de peso máximo de 1

kg, ver Figura 43, las cuales fueron colocadas en estanterías con iluminación artificial, humedad y temperatura constante, 26 °C, cada bolsa de unidad experimental cuenta con 350 gramos de arroz pre-cocido y 16 cc de inóculo del hongo *Trichoderma harzianum* con las respectivas cepas, Desarrolladas en medios de cultivo haba en el laboratorio de producción de organismos entomopatógenos en el departamento de biotecnología –BIOMag- del ingenio Magdalena.



Figura 43: unidad experimental utilizada por cada cepa evaluada

#### d. Arreglo Espacial de la investigación

Croquis de la distribución de las unidades experimentales Figura 44.

CGM 14-08	CG 14 -16	
CGM 14-07	CG 14 -15	
CG 14-06	CG 14 -14	
CG 14-05	CGL 14 -13	MAGDALENA
CGM 14-04	CG 14 -12	CG 14 -20
CGC 14-03	CGL 14 -11	CG 14 -19
CG 14-02	CG 14 -10	CG 14 -18
CG 14-01	CGC 14 -09	CG 14 -17
ESTANTE 1	ESTANTE 2	ESTANTE 3

Figura 44: Distribución de unidades experimentales en el laboratorio

e. Variables respuesta:

- Concentración de conidios/g

Producción de conidios individual para cada cepa evaluada en sustrato solido de arroz.

- Porcentaje de antagonismo

(Alvarez & Sivila, 2013) Citan que se tratan de pruebas de laboratorio que implican entre 4 a 10 días, para inferir en la especie de hongo patógeno particular, los posibles mecanismos de acción que ejerce *Trichoderma* en condiciones de laboratorio.

- Antagonismo por medio de competencia por espacio o nutrientes

Permite inferir la capacidad competitiva de *Trichoderma* frente al hongo patógeno, para la presente investigación se evaluará el hongo *Cephalosporium sacchari*.

- Antagonismo por medio de producción de metabolitos volátiles

Busca verificar la producción por parte de *Trichoderma* de sustancias tóxicas volátiles para otros microorganismos en este caso para *Cephalosporium sacchari*.

### **3.4.3. Manejo del Experimento**

A. Obtención de inóculo de *Trichoderma harzianum*:

Se utilizó la siguiente metodología:

- Desarrollo: se mantuvo 6 días en este periodo, con condiciones necesarias para desarrollo de micelio de *T. harzianum*.

- Aislamiento: se colocó el micelio obtenido de medios PDA para crecimiento mayor de micelio.
- Deshidratación: fue necesario eliminar el exceso de humedad para evitar contaminaciones externas, en condiciones homogéneas hasta 8 días.
- Formación de solución madre: se extrajo micelio del cultivo de *T. harzianum* y se diluyó en Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada, denominado matriz.

Posteriormente realizadas las matrices con *T. harzianum*, se realizaron conteos de conidios, con la cámara de conteos de neubeuer donde se determinó la concentración de UFC/ ml con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración UFC}}{\text{mL}} = \left( \frac{\bar{X} \text{ conteos}}{\text{campo}} \right) \times 10,000 \times \text{Volumen de matriz}$$

Con el uso del principio de concentraciones que se explica por la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración 1} \times \text{Volumen 1} = \text{Concentración 2} \times \text{Volumen 2}$$

Obtenido el dato de conidios/ml, se procedió a llevar todas las matrices con las cepas evaluadas a la misma concentración para mantener a las cepas en las mismas condiciones iniciales, concentración de  $2 \times 10^5$  ufc/ml, por lo que se realizaron diluciones, Luego de la formación de la matriz madre con la concentración requerida, se tomaron 16 cc de dicha solución para agregar en los sustratos a evaluar.

#### B. Manejo de la Bioseguridad:

El manejo de la bioseguridad dentro del laboratorio es prioritario para evitar contaminación de los sustratos y presente sesgo en los datos a obtener, por lo que fue aplicado el protocolo de bioseguridad del laboratorio, las normas principales la higiene

del personal como: ducharse antes del ingreso a la sala de producción, limpieza constante con alcohol al 95% del área de trabajo, uso de equipo de protección como mascarillas, guantes y calzado desechable, entre otros.

### C. Condiciones del laboratorio

El manejo del experimento en cuanto al entorno son las condiciones del laboratorio de producción de hongos entomopatógenos con temperatura 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.

### D. Desinfección de los sustratos

El proceso de desinfección de los sustratos consistió en diferentes fases:

#### a. Fase de Cocción:

Esta fase fue realizada con el fin de ablandar la capa externa del arroz para mejorar así las condiciones para la colonización por parte del hongo, dicho proceso se realizó por 5 minutos como se muestra en la Figura 45



*Figura 45: Proceso de cocción del arroz*

b. Fase de Embolsado:

Se eliminó el exceso de humedad por medio de coladores industriales para luego embolsar en bolsas de celofán de 30.5 cm de alto y 25.5 cm de ancho, con volumen correspondiente a 1/3 del volumen en sustrato, arroz, selladas con 3 grapas, Figura 46.



*Figura 46: Fase de remoción de exceso de humedad, pesado y embolsado de los sustratos*

c. Fase de Esterilización

La Esterilización del sustrato se realizó con el proceso de esterilización húmeda en autoclave, a 20 PSI de presión, ver Figura 47.



*Figura 47: Proceso de esterilización húmeda con Autoclave*

d. Fase de enfriamiento:

Enfriamiento por media hora para facilitar la manipulación de las bolsas al salir del proceso de esterilización, ver Figura 48.



*Figura 48: Bolsas de celofán con sustrato salidas del proceso de desinfección en enfriamiento*

e. Inoculación de sustrato

Con la ayuda del inyector calibrado fue posible la adición de 16 cc de la solución con *Trichoderma* de cada cepa en todas las bolsas y el agitador magnético para la homogenización de la solución y evitar deposiciones, ver Figura 49.



*Figura 49: inoculación de los sustratos con las solución de trichoderma*

#### f. Desarrollo de micelio

Periodo de 6 días posterior a la inoculación de sustratos en el cual se desarrolla la mayor parte del micelio de *Trichoderma* en las bolsas de celofán, debido al sello de la bolsa la humedad no sale de la misma lo que mantuvo el ambiente idóneo para esta fase, la temperatura, humedad y luminosidad son constantes.

#### g. Desarrollo de estructuras reproductivas

Periodo en el cual se expone el micelio de *Trichoderma* a stress por la deshidratación del sustrato, lo que provoca que el hongo produzca estructuras reproductivas; esta fase se realiza en bandejas de plástico, Figura 50.



*Figura 50: Fase de desarrollo de estructuras reproductivas en bandeja de plástico*

#### h. Almacenamiento

Posterior a 10 días en bandeja y nivel de humedad del 15%, se almacenaron en bolsas de papel manila y llevado hacia el cuarto frio el cual mantiene la temperatura de 2 grados centígrados, ver Figura 51.



Figura 51: Fase de almacenamiento en las instalaciones del cuarto frío del ingenio Magdalena S.A.

## E. Recolección de datos

### a. Número de unidades formadoras de colonias –UFC- o conidios por/ gr:

El concentración de conidios se determinó por medio del uso de la cámara de conteo de Neubauer, la cual contiene dos zonas deprimidas en cuyo fondo tiene cuadrícula de dimensiones conocidas, Sin embargo para realizar conteos en este instrumento fue necesario diluir la muestra, por lo que se tomaron alícuotas de solución madre en diluciones sucesivas, realizado de la siguiente manera, (Figura 52).

1. Se agitaron 10 gramos de sustrato en 500 ml de agua, matriz, inicial.
2. Se tomó la alícuota de 1 ml de la matriz inicial y fue diluida en 9 ml de agua destilada, solución transitoria.
3. Con pipeta de volumen conocido y se agregó dicho volumen en la cámara de conteo de Neubauer.
4. Se contabilizaron conidios en 10 campos distintos en cada zona de depresión y determinar la media general.



Figura 52: Flujo grama para el conteo de unidades formadoras de colonias/g.

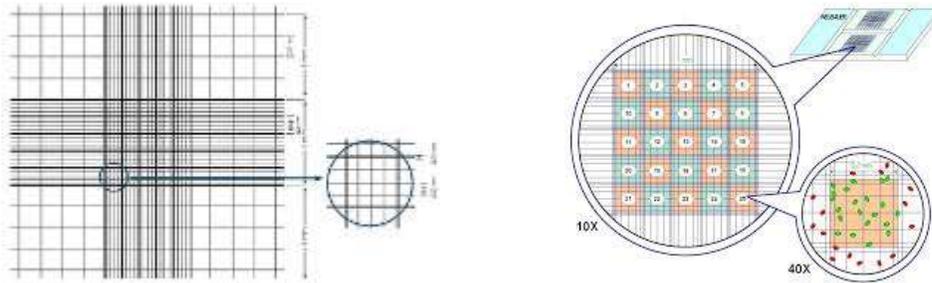


Figura 53: Diagrama de conteo de microorganismos con cámara de conteo de Neubauer

La densidad de microorganismos para cada cepa se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración conidios}}{\text{g de sustrato}} = \frac{\left( \frac{\bar{X} \text{ conteos}}{\text{campo}} \right) \times 10,000 \times \text{Vol. Inicial} \times \text{Dilución 1} \times \text{Dilución 2}}{\text{Peso de sustrato utilizado}}$$

## B. Antagonismo

### b. Antagonismo por medio de competencia por espacio o nutrientes:

Con cultivo puro de *Cephalosporium sacchari* y de cada cepa de *T. harzianum*, en ambos casos se extrae la sección de colonia de aproximadamente 2mm<sup>2</sup>, los que se colocan en los extremos opuestos de la caja de Petri con medio de cultivo Agar papa glucosado al 2% (APG 2%) separados 3 cm. Luego del periodo de incubación de 72 horas a 25°C, se evalúa el efecto antagónico mediante el porcentaje de inhibición del

crecimiento radial del patógeno (%), Donde se aplica la siguiente ecuación de Royse and Ries:

$$\% \text{ Antagonismo} = 100 \times \left[ \frac{r_1 - r_2}{r_1} \right]$$

r1= crecimiento radial del patógeno

r2= crecimiento radial del patógeno, en orientación directa al crecimiento de *Cephalosporium sacchari*.

c. Antagonismo por medio de metabolitos volátiles:

Se requiere al igual que en la prueba anterior cultivos puros de *Cephalosporium sacchari* y *T. harzianum*, Se siembra cada hongo con sección de 2mm<sup>2</sup> en el centro de la caja de Petri con medio APG 2%, luego se substituye las respectivas tapas de las cajas de Petri por disco de papel celofán estéril, con la unión de ambas bases con cinta adhesiva. Paralelamente se siembra en otra caja de Petri con APG 2% el hongo fitopatógeno quien cumplirá la función de testigo sin antagonista.

Las cajas así acondicionadas se colocan en estufa de cultivo durante 7 días, momento en que se mide el crecimiento radial de *Cephalosporium sacchari* enfrentado a *T. harzianum* y del testigo, La diferencia de crecimiento de la colonia del patógeno, estará en función de la producción de metabolitos volátiles que difunden desde la colonia de *Trichoderma*, hacia la colonia del patógeno.

Se aplica la ecuación de Royse and Ries, donde r1 representa el crecimiento radial de la colonia del patógeno testigo y r2 el crecimiento radial de la colonia del patógeno frente a *Trichoderma*.

### 3.4.4. Resultados

#### A. Concentración de conidios:

Se realizaron los conteos de concentración de UFC/g a 3 diferentes lotes de producción con diferencia de 7 días entre ellos, obtenidos para cada cepa analizada con cámara de conteo de Neubauer, dicho proceso se realizó en almacenamiento de los diferentes lotes, ver Figura 54.

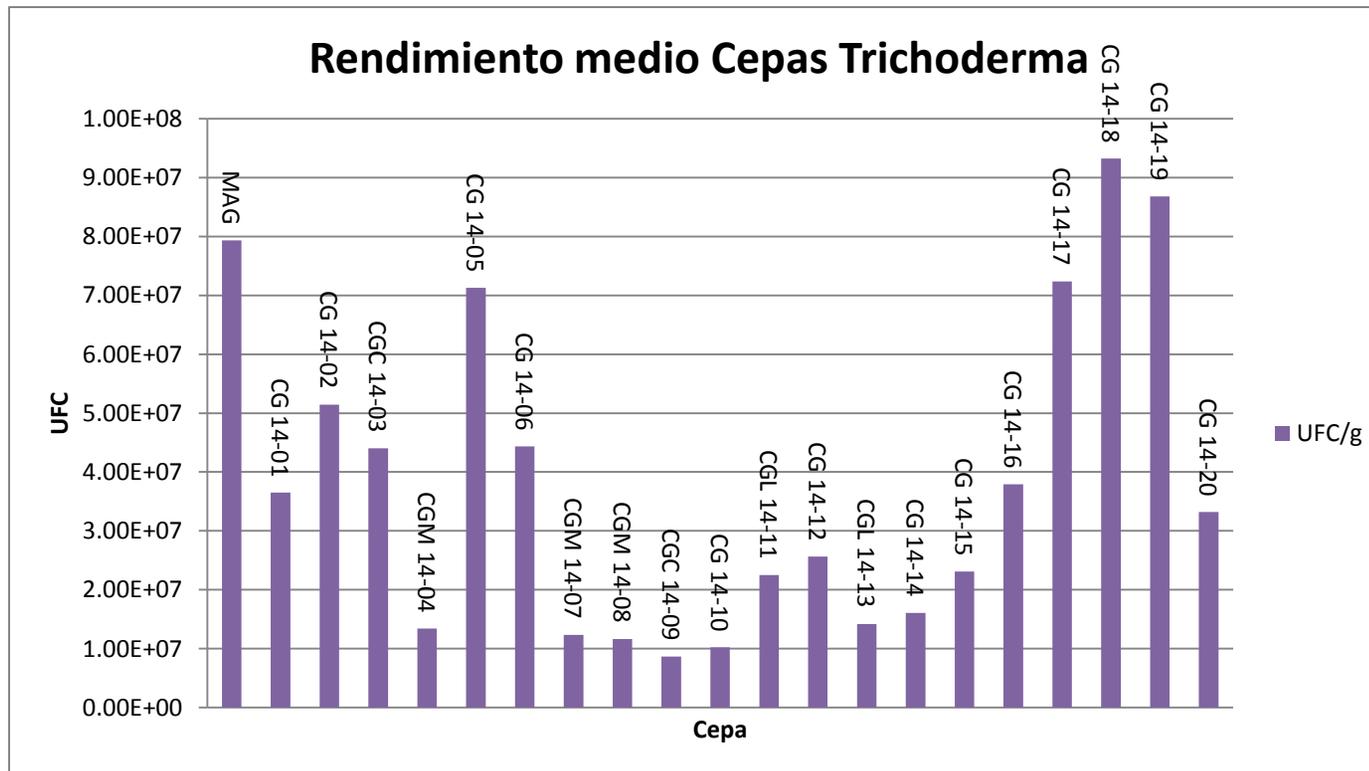


Figura 54: Concentración de UFC/g de 20 cepas de *T. harzianum* en 3 diferentes lotes de producción en almacenamiento

Se puede observar las variaciones presentes en la figura 54, en la cual la cepa CG 14-18 presenta rendimiento medio general mayor a las demás cepas ( $9.33 \times 10^7$  conidos/g), esto debido a variabilidad en el material de origen.

Se plantean hipótesis estadísticas a probar, para este caso:

**Hipótesis nula:** no existen diferencias estadísticas, lo que se refiere a que todas las cepas de *Trichoderma sp.* Producen la misma concentración de UFC/g en el sustrato arroz.

**Hipótesis alterna:** si existen diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, lo que se refiere a que todas las cepas de *Trichoderma sp.* o al menos una Producen diferente concentración de UFC/g en el sustrato arroz.

Para analizar numéricamente dicha gráfica se procedió a realizar análisis de varianza -ANDEVA- con confiabilidad del 95%, con el software estadístico INFOSTAT, con los siguientes resultados.

Se observa la probabilidad de aceptación de la hipótesis nula es menor a la significancia, 0.05, ver Cuadro 30, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, por lo que se detecta que si existen diferencias estadísticamente significativas entre la producción de UFC/g entre las diferentes cepas evaluadas, debido a esta razón se procedió a realizar análisis TUCKEY de comparación de medias, significancia del 5%, con el cual se pretende analizar las diferencias individuales entre las cepas con el fin de recomendar las mejores cepas.

## Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
UFC/g	63	0,58	0,38	71,97

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	44852003472222200,00	20	2242600173611110,00	2,92	0,0017
Cepa	44852003472222200,00	20	2242600173611110,00	2,92	0,0017
Error	32219156250000000,00	42	767122767857143,00		
Total	77071159722222200,00	62			

Cuadro 30: Resultados del análisis de varianza para la variable rendimiento de Conidios de *Trichoderma* para las diferentes cepas.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=85990144.08316

Error: 765695998412698.3750 gl: 42

Cepa	Medias	n	E.E.
CG 14-18	93266666.67	3	15975981.96 A
CG 14-19	86700000.00	3	15975981.96 A
MAG	79266666.67	3	15975981.96 A
CG 14-17	72333333.33	3	15975981.96 A
CG 14-05	71300000.00	3	15975981.96 A
CG 14-02	51416666.67	3	15975981.96 A
CG 14-06	44366666.67	3	15975981.96 A
CGC 14-03	44016666.67	3	15975981.96 A
CG 14-16	37933333.33	3	15975981.96 A
CG 14-01	36500000.00	3	15975981.96 A
CG 14-20	33233333.33	3	15975981.96 A
CG 14-12	25683333.33	3	15975981.96 A
CG 14-15	23100000.00	3	15975981.96 A
CGL 14-11	22500000.00	3	15975981.96 A
CG 14-14	16100000.00	3	15975981.96 A
CGL 14-13	14226666.67	3	15975981.96 A
CGM 14-04	13416666.67	3	15975981.96 A
CGM 14-07	12350000.00	3	15975981.96 A
CGM 14-08	11666666.67	3	15975981.96 A
CG 14-10	10283333.33	3	15975981.96 A
CGC 14-09	8683333.33	3	15975981.96 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Se puede observar que en los tres diferentes lotes, la cepa que representó mayor rendimiento medio de UFC/g es la cepa CG 14-18 con concentración media de  $9.3 \times 10^7$  Conidios/g, seguida por las cepas: CG 14-19 con concentración media de  $8.7 \times 10^7$  Conidios/g y la cepa magdalena con concentración media de  $7.9 \times 10^7$  Conidios/g, considerándose como las más rendidoras para las condiciones del laboratorio de producción de entomopatógenos del ingenio magdalena.

Con el fin de caracterizar de manera más amplia las bondades de las cepas evaluadas, se procedió a realizar pruebas de control de calidad que exponen características antagonistas de interés con organismo específicos.

## B. Pruebas de control de calidad antagonista:

- a. Prueba de cultivos duales: Esta prueba propone competición directa del patógeno en este caso *Cephalosporium sacchari* sp., Con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. Y observar los radios de crecimiento efectivo del patógeno como se observa a continuación:

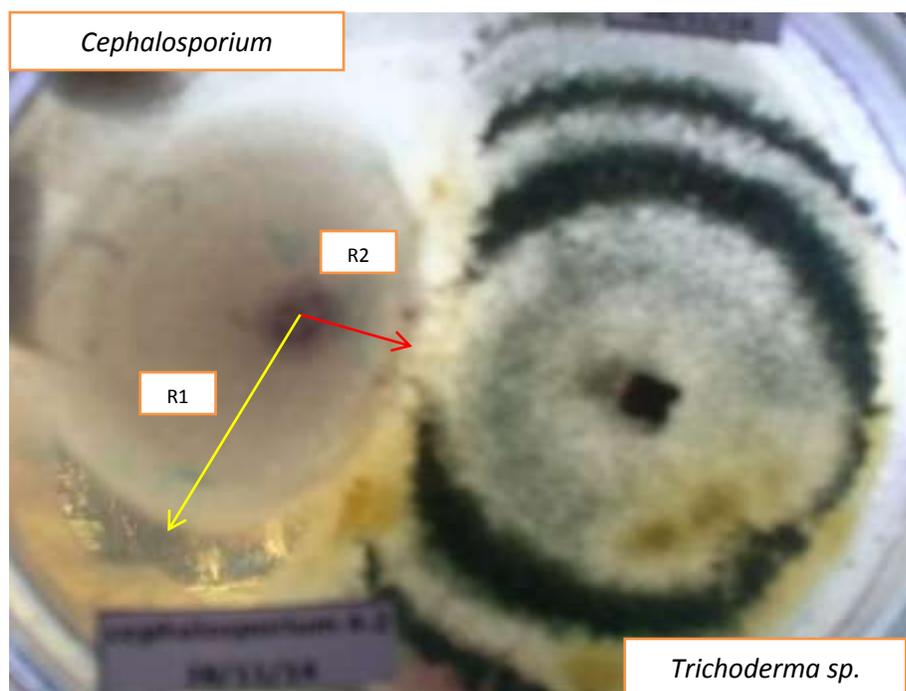


Figura 55: Prueba de control de calidad de Cultivos duales con interacción de *T. harzianum* contra *Cephalosporium sacchari*

Con la temperatura constante de 25 °C y fotoperiodo de 12 horas en cámara bioclimática, se midieron los radios efectivos para determinar el porcentaje de antagonismo por competencia directa a las 72 y 96 horas, con los siguientes resultados:

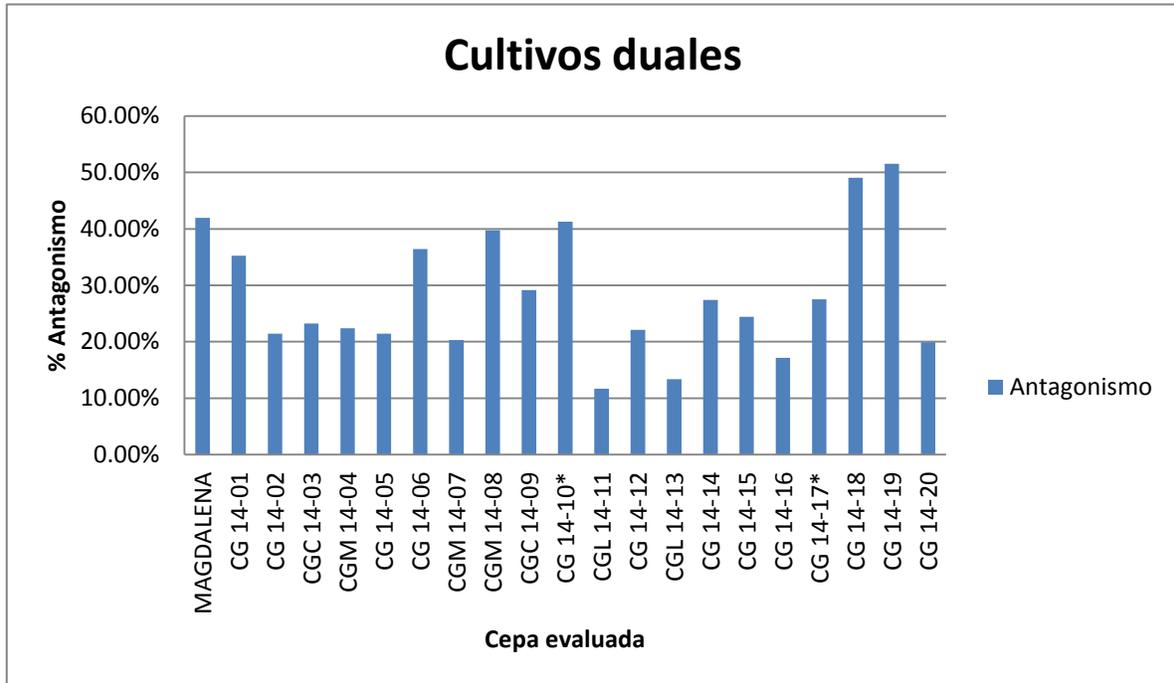


Figura 56: Porcentaje de antagonismo de *Trichoderma sp* sobre *Cephalosporium sacchari* a las 96 horas

Se puede observar en la gráfica de la Figura 56 que las cepas CGC 14-19 y CG 14-18 presentan mayor nivel de antagonismo a las 96 horas, mientras que las cepas CGM 14-11 y CGL 14-13 presentan el nivel de antagonismo más bajo debido a que el crecimiento en micelio no representó obstáculo significativo para el crecimiento radial de *Cephalosporium sacchari*, atribuido a la heterogeneidad en la replicación del material inicial y a menor rapidez de producción de micelio de ciertas cepas, por lo que es necesario realizar más pruebas para ampliar dicha teoría.

b. Prueba de placas sobrepuestas:

El objetivo es verificar la producción por parte de *Trichoderma* de sustancias tóxicas volátiles para otros microorganismos, dicha prueba consiste en colocar en medios de cultivo sobrepuestos aislados únicamente por papel celofán, porciones de micelio de *Trichoderma* y organismos de interés en este caso *Cephalosporium*

*sacchari*, es necesaria la siembra de porciones de micelio de *Cephalosporium sacchari* aislado como testigo como se muestra en las siguientes imágenes:

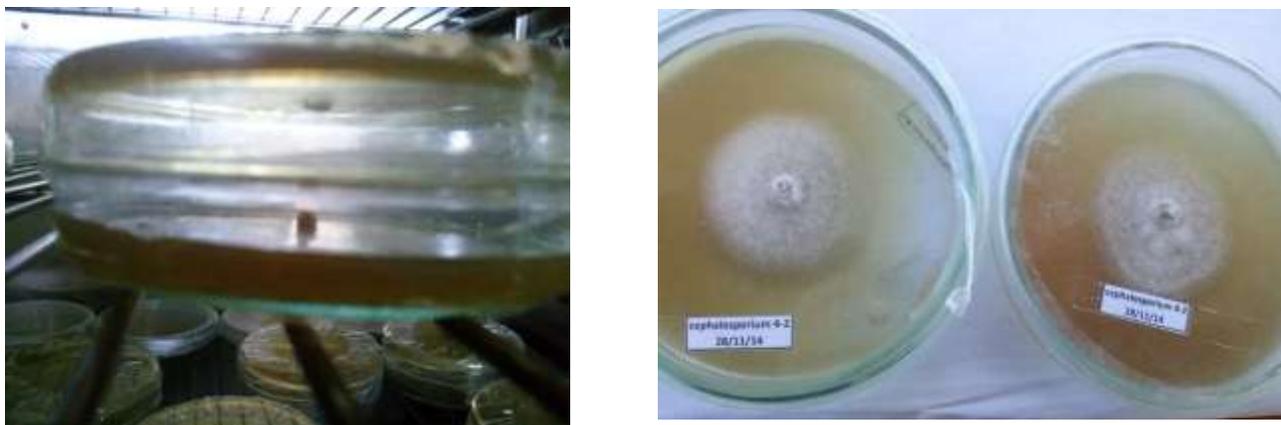


Figura 57: Prueba de control de calidad de placas sobrepuestas con interacción de *Trichoderma sp.* contra *Cephalosporium sacchari sp.*

Se realizó la comparación del nivel del antagonismo para 21 cepas de *Trichoderma*, ver Figura 58.

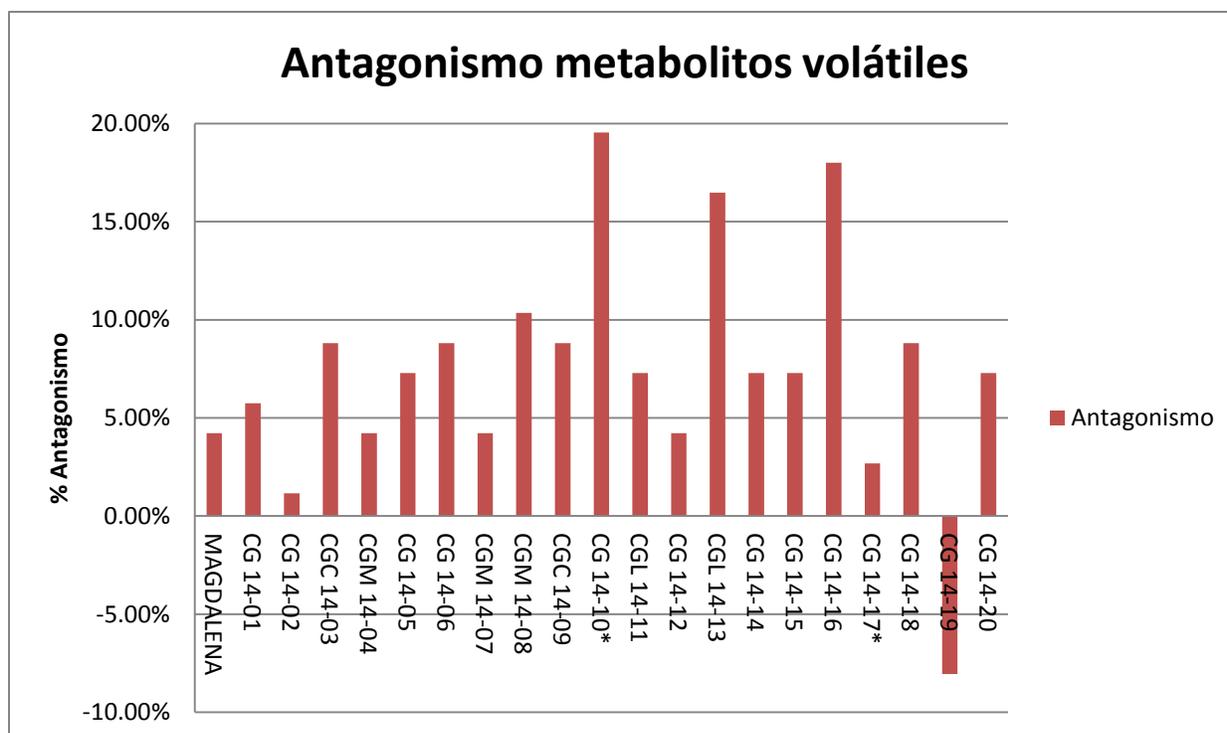


Figura 58: Porcentaje de antagonismo de *Trichoderma sp.* sobre *Cephalosporium sacchari sp.* por medio de la producción de metabolitos volátiles

Se puede observar que el gráfico la acción de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Cephalosporium sacchari* a causa de la producción de metabolitos volátiles únicamente, debido a que ambos cultivos se encuentran aislados completamente uno del otro, donde se aprecia que las cepas CG 14-10, CG 14-16 y CGL 14-13 presentan el mayor nivel de antagonismo en comparación al cultivo testigo con valores superiores al 15% considerándose como las mejores cepas productoras de compuestos volátiles, sin embargo se observa que el micelio de *Cephalosporium sacchari* expuesto a la cepa CG 14-19 presenta el crecimiento radial superior al testigo, razón por la cual contiene valor negativo de porcentaje de antagonismo en la prueba de placas sobrepuestas.

Dicha prueba se ha llevado a cabo únicamente 1 vez por lo que es necesaria la replicación en más repeticiones con el fin de contar con datos más concluyentes y que validen los datos ya obtenidos.

#### 3.4.5. Conclusiones

- A. Se determinó en 3 diferentes lotes que las cepas que presentaron mayor producción de unidades formadoras de colonias medio son: CG 14-18, CG 14-19 y la cepa magdalena con rendimientos medios de  $9.3 \times 10^7$ ,  $8.7 \times 10^7$  y  $7.9 \times 10^7$  UFC/g respectivamente.
- B. Se realizaron 2 diferentes pruebas de calidad en cuanto al nivel de antagonismo que presentaban las cepas de *Trichoderma sp.* frente al patógeno *Cephalosporium sacchari sp.* mostrándose la cepa CG 14-19 como la que presenta mayor antagonismo por competición directa, y la cepa CG 14-10 como la que presenta mayor antagonismo por la producción de metabolitos volátiles.

### 3.4.6. Recomendaciones

- A. Replicar las pruebas de control de calidad con el fin de validar los datos ya obtenidos.
- B. Evaluar la viabilidad de las cepas en diferentes condiciones de almacenamiento.
- C. Evaluar las mejores cepas productoras en diferentes sustratos para evaluar la respuesta a los mismos.

### 3.4.7. Evaluación

#### A. Aspectos positivos:

- Disponibilidad de material para propagación masiva en sustrato arroz.
- Apoyo por parte de CENGICAÑA en proveer el material genético de evaluación.
- Disponibilidad del uso de equipo de Esterilización y Desinfección para el establecimiento y la manipulación del material de investigación.

#### B. Aspectos negativos:

- Alto peligro de contaminación de patógenos como *Aspergillus* y *Penicillium* al sustrato de propagación.
- Alto peligro de contaminación genética entre esporas de las diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* evaluadas.

### 3.4.8. Referencias

Alvarez, S., & Sivila, N. (2013). *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar: producción artesanal de Trichoderma*. Jujuy, Argentina.

De Luna , S. E., Rojas, V. G., Alemán , H. E., Arévalo, N. K., & Morales, R. L. (2001). DESARROLLO Y EVALUACION DE FORMULACIONES DE BIOINSECTICIDAS A PARTIR DE *B. thuringiensis* PARA EL CONTROL DE PLAGAS DE CAÑA DE AZÚCAR. *Memorias del X Congreso Nacional y IV Internacional de Ciencias Básicas*. 21, págs. 921 - 931. Monterrey: Revista internacional de Ciencias Ambientales.

Lastra, B., & Gómez, L. (2006). *la cría de Diatraea saccharalis para la producción masiva de enemigos naturales*. Cali, Colombia: Cenicaña.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA -FAUSAC-  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS  
Y AMBIENTALES -IIA-



REF. Sem. 55/2015

LA TESIS TITULADA:

"EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SOLIDOS  
PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE  
*Trichoderma sp. Cepa* MAGDALENA, LA  
DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA,  
C.A."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

JORGE LUIS SANDOVAL AGUIRRE

CARNE:

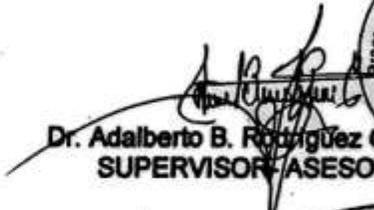
201015227

HA SIDO EVALUADO POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Gustavo Alvarez Valenzuela  
Ing. Agr. Alvaro Hernández  
Dr. Adalberto Rodríguez

Los Asesores y la Dirección del Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales de la Facultad de Agronomía, hace constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y el Reglamento de este Instituto. En tal sentido pase a la Dirección del Área Integrada para lo procedente.

  
Ing. Agr. Manuel de Jesús Martínez Ovalle  
A S E S O R

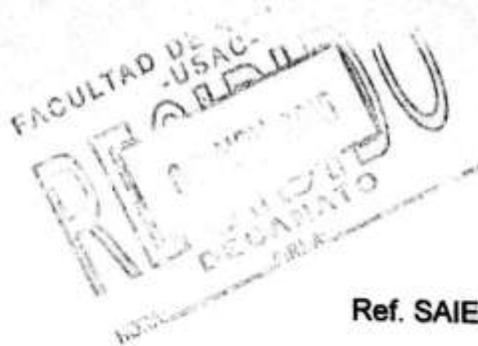
  
Dr. Adalberto B. Rodríguez García  
SUPERVISOR/ASESOR



  
Ing. Agr. Waldemar Nunez  
DIRECTOR DEL IIA



WNR/nm  
c.c. Archivo



Guatemala, 5 de noviembre de 2015

Ref. SAIEPSA: Trabajo de Graduación 62-2015

TRABAJO DE GRADUACIÓN:

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* cepa MAGDALENA; DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL INGENIO MAGDALENA S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A.

ESTUDIANTE:

JORGE LUIS SANDOVAL AGUIRRE

No. CARNÉ

201015227

Dentro del Trabajo de Graduación se presenta el Capítulo II que se refiere a la Investigación Titulada:

"EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma sp.* Cepa MAGDALENA, LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A."

LA CUAL HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Gustavo Alvarez Valenzuela  
Ing. Agr. Alvaro Hernández  
Dr. Adalberto B. Rodríguez García

Los Asesores de Investigación, Docente Asesor de EPSA y la Coordinación del Área Integrada, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y Reglamento de la Facultad de Agronomía. En tal sentido, pase a Decanatura.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



Adalberto B. Rodríguez García  
Docente - Asesor de EPS



Vo.Bo. Ing. Agr. Silver A. Elías Gramajo  
Coordinador Área Integrada -EPS

c.c. Control Académico, Estudiante, Archivo,

Guatemala, 22 de octubre de 2015

Ing. Agr.

Silvel Elías Gramajo

Coordinador Área Integrada y EPSA

Facultad de Agronomía



Ing. Elías Gramajo:

Informo a usted que he revisado el documento de graduación del estudiante Jorge Luis Sandoval Aguirre, Carné estudiantil No.2010-15227, Titulado: TRABAJO DE GRADUACION REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MAGDALENA (BIOMag.), DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRÍCOLA, INGENIO MAGDALENA, s. a.. LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C. A.

*Considerando que ya cumple con los requisitos para su aprobación y graduación.*

Atentamente.

Dr. Adalberto B. Rodríguez García  
Docente – Asesor de EPSA

No.77.2015

Trabajo de Graduación: "EVALUACIÓN DE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichodema harzianum* cepa MAGDALENA; DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL INGENIO MAGDALENA, S.A., LA DEMOCRACIA, ESCUINTLA, GUATEMALA, C.A."

Estudiante: Jorge Luis Sandoval Aguirre

Carné: 201015227

**"IMPRIMASE"**



Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López  
DECANO



