

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated on a throne. Above the figure is a crown and a cross. The figure is flanked by two columns, each topped with a crown. The Latin motto "SICUT ERAT" is inscribed on the left column, and "SICUT ERAT" is on the right. The outer ring of the seal contains the text "UNIVERSITAS CAROLINA GUATEMALENSIS" at the top and "SIGILLUM UNIVERSITATIS CAROLINAE GUATEMALENSIS" at the bottom. The text "SICUT ERAT" is also visible on the left and right sides of the seal.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN
REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ENTOMOLOGÍA DEL
CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE
AZÚCAR. – CENGICAÑA -**

MÓNICA GABRIELA EBERT GARCÍA

GUATEMALA, JULIO DE 2009.

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

**TRABAJO DE GRADUACIÓN
REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ENTOMOLOGÍA DEL CENTRO
GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR. –
CENGICAÑA -**

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

**POR
MÓNICA GABRIELA EBERT GARCÍA
EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO**

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

GUATEMALA, JULIO DE 2009.

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

RECTOR

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	MSc., Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO	MSc. Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL CUARTO	Br. Rigoberto Morales Ventura
VOCAL QUINTO	Br. Miguel Armando Salazar Donis
SECRETARIO	MSc. Edwin Enrique Cano Morales

GUATEMALA, Julio 2009.

Guatemala, 9 de julio 2009.

**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 Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar – CENGICAÑA, como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

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

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

MÓNICA GABRIELA EBERT GARCÍA

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Gracias SEÑOR por permitirme llegar hasta aquí, gracias por todas las BENDICIONES que me has regalado a pesar de todo, nada más GRACIAS DIOS MÍO.

A mis Padres:

María Teresa García de Ebert y Federico Kurt Ebert Cifuentes

A ustedes por darme la vida, guiarme por el buen camino, por apoyarme con mis hijas, estar ahí cuando más necesite y por comprender mis errores, DIOS los BENDIGA toda la vida, los Amo.

A mi Esposo:

Luis Fernando Izaguirre, gracias por el apoyo en todo momento, también te agradezco por este logro ya que engrandece más a nuestra familia y nuestras hijas tienen dos ejemplos a seguir que son un impulso para no desmayar jamás. AMOR, nuestro cambio para toda la vida, llegó.

A mis Hijas:

Katheryn Gabriela e Isabela Nycoll, mis hijas, este esfuerzo es para que su futuro sea de bienestar y seguridad, cada día de estudio, cada noche de desvelo, cada segundo sin ustedes y dedicado al estudio fue para darles una vida mejor. Las AMO con todo mi corazón y este regalo es para ustedes.

A mis hermanos:

Ericka Marlene, te comparto mi alegría y mi esfuerzo, vos sabes que nos espera una vida mejor, seguí adelante y que tus sueños y aspiraciones sean hechas realidad, TE QUIERO MUCHO.

Ernesto Kurt (Nene) (Q.E.P.D.), la vida no te dio tiempo de vivir, más sin embargo fuiste un amigo y un hermano muy moleστόn y alegre. Yo no te hago muerto, estás vivo en mi corazón y mis recuerdos, pero tengo la convicción de que nos volveremos a ver cuando DIOS quiera, TE EXTRAÑO.

A mi Suegra y Cuñado:

Lilian Anselma Izaguirre y Carlos Ovidio Izaguirre, gracias por el apoyo para culminar mis estudios, que DIOS derrame BENDICIONES en ustedes y su familia.

A mis Abuelos:

María Teresa Ortíz, Gustavo García, Melida Cifuentes y Ernesto Kurt Ebert Schmitt, gracias por el apoyo brindado y por regalarme el pase para realizar mis sueños.

A mi Familia en general:

Gracias a cada uno por colaborar en la culminación de mis estudios de grado.

Al Público en General:

Gracias por acompañarme en esta fiesta.

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A mi Mazatenango Lindo:

Tierra que me vió crecer.

Al colegio La Ilustración:

Por formarme en los primeros años de vida.

Al instituto Julio César Méndez Montenegro:

Por la formación agrícola que recibí en sus aulas.

A la Escuela Nacional Central de Agricultura – ENCA-

Mi alma máter, formadora de conocimientos agrícolas, con la que digo que, el “Aprender haciendo” es una realidad. Mi escuelona, que me brindó una educación de primera clase, la que me acompañó en mi adolescencia y en donde encontré el amor de mi vida.

A la Facultad de Agronomía –FAUSAC-

Pionera de profesionales en el área agrícola, gracias por abrir tus puertas y hacerme una profesional de bien, tus aulas relatan las historias de clases durante 5 años de mi vida.

Al Centro guatemalteco de investigación y capacitación de la caña de azúcar – CENGICAÑA-

Por darme la oportunidad de terminar mi formación académica y por abrirme sus puertas hacia un mundo nuevo.

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Mario Melgar:

Por apoyarme en la realización del ejercicio profesional supervisado de la FAUSAC.

A Dra. Andrea Maldonado:

Gracias por enseñarme el mundo de la Biotecnología y por formar parte de los proyectos a desarrollarse en el laboratorio. Gracias por sus asesorías y la enseñanza para convertirme en una profesional.

Al Ing. Agr. Werner Ovalle:

Muchísimas gracias por sus asesorías y enseñanzas, por la confianza adquirida, por ser buen amigo y muy buen maestro.

Al Ing. Agr. Manuel Márquez:

Por permitirme realizar mi ejercicio profesional supervisado, gracias por la confianza depositada en mi persona y por sus asesorías.

Al Ing. Ezequiel López:

Por sus asesorías, supervisiones y por ser un buen amigo.

Al Ing. Agr. Filadelfo Guevara:

Gracias ingeniero por su sinceridad, asesoría y consejos para elaboración de la tesis de grado.

Al Personal de CENGICAÑA:

Gracias por el apoyo, en especial a la Inga. Agr. Patricia Aguirre, Ing. Salomón García, Br. Ernesto Pérez, Licda. Priscila López, y a los demás amigos que estuvieron conmigo a través de todo el E.P.S.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
Indice de figuras.....	iv
Indice de cuadros.....	v
Resumen.....	vii
CAPÍTULO I. DIAGNÓSTICO DEL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR – CENGICAÑA, SANTA LUCÍA COTZUMALGUAPA, ESCUINTLA.....	
1.1. Presentación.....	3
1.2. Marco referencial.....	4
1.2.1. Antecedentes.....	4
1.2.2. Ubicación del área de Biotecnología.....	5
1.3. Objetivos.....	6
1.4. Metodología.....	7
1.4.1. Entrevistas personales.....	7
1.4.2. Revisión bibliográfica.....	7
1.4.3. Compilación de informes realizados por el personal del área de biotecnología.....	9
1.4.4. Exploración del laboratorio de Biotecnología.....	9
1.5. Resultados.....	10
1.5.1. Organización del área de Biotecnología.....	10
1.5.2. Función del área de Biotecnología.....	11
1.5.3. Descripción de los proyectos realizados desde 1997 a 2007.....	11
1.5.4. Identificación del equipo y material existente en el laboratorio de Biotecnología.....	14
1.5.5. Detección de las necesidades del área de Biotecnología.....	16
1.6. Conclusiones y Recomendaciones.....	17
1.7. Bibliografía.....	19
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESPORULACIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS EN PLAGAS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR (<i>Saccharum</i> spp.) EN EL LABORATORIO DE CENGICAÑA, SANTA LUCÍA COTZUMALGUAPA, ESCUINTLA.....	
2.1. Presentación.....	23
2.2. Marco conceptual.....	24
2.2.1. Plagas de suelo que afectan la caña de azúcar.....	24
2.2.1.1. <i>Scaptocoris talpa</i> (Hemiptera; Cydnidae).....	24
2.2.1.2. <i>Dipropus</i> spp. (Coleoptera; Elateridae).....	24
2.2.1.3. <i>Phyllophaga</i> spp. (Coleoptera; Scarabaeidae).....	25
2.2.2. Control biológico de las plagas de la raíz.....	26
2.2.3. Hongos <i>Metarhizium ansipliae</i> y <i>Beauveria</i> spp. Como control de plagas de la raíz de la caña de azúcar.....	27
2.2.3.1. <i>Beauveria</i> spp.....	27
2.2.3.1.1. <i>Scaptocoris talpa</i>	27
2.2.3.1.2. <i>Dipropus</i> spp.	28

2.2.3.1.3 <i>Phyllophaga</i> spp.	28
2.2.3.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
2.2.3.2.1 <i>Scaptocoris talpa</i>	28
2.2.3.2.2 <i>Dipropus</i> spp.	29
2.2.3.2.3. <i>Phyllophaga</i> spp.	29
2.2.4. Factores que afectan la virulencia de los agentes de control biológico.....	29
2.2.5 Efecto de los factores abióticos sobre los hongos entomopatógenos.....	31
2.2.6 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los hongos.....	31
2.2.7 Efecto de la temperatura sobre la patogenicidad de los hongos.....	32
2.3. Objetivos.....	33
2.4. Hipótesis.....	34
2.5. Metodología.....	35
2.5.1. Metodología para establecer la mortalidad de las plagas evaluadas.....	35
2.5.1.1. Tratamientos.....	35
2.5.1.2. Descripción del material experimental.....	36
2.5.1.2.1. Inmaduros.....	36
2.5.1.3. Unidad experimental.....	36
2.5.1.4. Diseño experimental.....	37
2.5.1.5. Manejo del experimento.....	38
2.5.1.5.1. Colecta de inmaduros.....	38
2.5.1.5.2. Clasificación de inmaduros.....	38
2.5.1.5.3 Manejo de los insectos en el laboratorio.....	38
2.5.2. Metodología para determinar la temperatura con los mayores porcentajes de esporulación de los hongos evaluados.....	40
2.6. Resultados.....	41
2.6.1. Mortalidad.....	41
2.6.2. Esporulación.....	49
2.7. Conclusiones y Recomendaciones.	60
2.8. Bibliografía.....	62
2.9 Apendices.....	65

CAPÍTULO III. SERVICIOS REALIZADOS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR.-CENGICAÑA-.....

3.1. Presentación.....	75
3.2. Servicio 1. Extracción de ADN genómico de variedades de caña de azúcar.....	76
3.2.1. Objetivos.....	76
3.2.2. Metodología.....	76
3.2.2.1. Materiales.....	76
3.2.2.2. Equipo.....	77
3.2.2.3. Reactivos	77
3.2.2.4. Proceso.....	77
3.2.3. Resultados.....	83
3.2.4. Evaluación.....	83
3.2.5. Bibliografía.....	83
3.3. Servicio 2. Aplicación de la técnica de microsatélites en ADN genómico de las variedades de caña de azúcar, colección de trabajo de CENGICAÑA.....	84

3.3.1. Objetivo.....	84
3.3.2. Metodología de la técnica de Microsatélites de ADN en caña de azúcar.....	84
3.3.2.1 Materiales.....	84
3.3.2.2 Equipo.....	84
3.3.2.3 Reactivos.....	84
3.3.2.4. Mezcla de digestión.....	85
3.3.2.6. Proceso.....	85
3.3.3. Resultados.....	86
3.3.4. Evaluación.....	86
3.4. Servicio 3 Preparación e implementación de geles de poliacrilamida.....	87
3.4.1. Objetivos.....	87
3.4.2. Metodología.....	87
3.4.3 Resultados.....	87
3.4.3.1 Metodología para la preparación y carga de geles de poliacrilamida.....	87
3.4.4. Evaluación.....	95
3.5. Otros Servicios.....	95
3.5.1. Área de biotecnología.....	95
3.5.2. Programa de Manejo Integrado de Plagas.....	98

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Unidad experimental en donde se observan larvas de <i>Dipropus sp.</i> dentro de una caja petri.....	36
Figura 2.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga sp.</i> y <i>Dipropus sp.</i>	42
Figura 3.	Porcentaje de mortalidad hasta el día 6 después de inoculación de los inmaduros con los hongos evaluados.....	42
Figura 4.	Residuos para la variable mortalidad.....	44
Figura 5.	Residuos transformados con la prueba de Bartlett para la variable Mortalidad.....	45
Figura 6.	Comportamiento de la mortalidad de los inmaduros de las plagas evaluadas.....	47
Figura 7.	Comportamiento de la mortalidad ejercida por los hongos entomopatógenos.....	48
Figura 8.	Comportamiento de los residuos de la variable esporulación.....	51
Figura 9.	Comportamiento de los residuos transformados de la variable esporulación.....	52
Figura 10.	Representación del 80% de esporulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> en <i>Phyllophaga sp.</i>	53
Figura 11.	Esporulación en larvas de <i>Dipropus sp.</i> inoculadas con <i>Beauveria sp.</i>	53
Figura 12.	Comportamiento de la esporulación de los inmaduros evaluados.....	54
Figura 13.	Comportamiento de la esporulación de los inmaduros evaluados.....	57
Figura 14A.	Mapa de ubicación de las fincas muestreadas para esta investigación.....	65
Figura 15A.	Introducción de las larvas y ninfas en macetas con plántulas de arroz.....	66
Figura 16A.	Preparación del inóculo, conidias en un volumen de agua estéril.....	66
Figura 17A.	Inoculación de los inmaduros en la suspensión del hongo <i>M. anisopliae</i>	67
Figura 18A.	Cámara húmeda donde tomaron las lecturas de mortalidad y esporulación.....	67
Figura 19.	Diagrama de flujo para la elaboración de soluciones en la metodología de geles de agarosa.....	81
Figura 20.	Diagrama de flujo de las soluciones para la metodología de tinción con poliacrilamida.....	91

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Modelo de entrevista.....	8
Cuadro 2.	Equipo del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.....	14
Cuadro 3.	Materiales del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.....	15
Cuadro 4.	Reactivos del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.....	15
Cuadro 5.	Rangos de temperatura sobre los hongos <i>M. anisopliae</i> y <i>Beaveria</i> sp.....	32
Cuadro 6.	Tratamientos evaluados para la variable mortalidad.....	35
Cuadro 7.	Factores evaluados para la variable mortalidad.....	35
Cuadro 8.	Porcentajes de mortalidad por tratamiento, laboratorio CENGICAÑA 2007..	41
Cuadro 9.	Resultados de porcentaje de mortalidad ajustados con la fórmula de Abbott..	43
Cuadro 10.	Porcentaje de mortalidad promedio para los inmaduros de las plagas evaluadas.....	46
Cuadro 11.	Resumen del ANDEVA para la variable transformada de mortalidad, laboratorio de CENGICAÑA, 2007.....	48
Cuadro 12.	Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias para el factor hongo.....	49
Cuadro 13.	Resultados de porcentaje de esporulación para cada tratamiento, laboratorio de CENGICAÑA, 2007.....	50
Cuadro 14.	Porcentaje de esporulación promedio para los inmaduros de las plagas evaluadas.....	54
Cuadro 15.	Porcentaje de esporulación promedio para los inmaduros inoculados con los hongos evaluados.....	55
Cuadro 16.	Resumen del ANDEVA para la variable esporulación.....	57
Cuadro 17.	Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias para la interacción temperatura, plaga y hongo.....	58
Cuadro 18A.	Coordenadas de las fincas muestreadas en la investigación.....	66
Cuadro 19A.	Prueba de Bartlett para la variable mortalidad, datos no transformados.....	69
Cuadro 20A.	Prueba de Bartlett para la variable esporulación, datos no transformados...	70
Cuadro 21A.	Transformación de los porcentajes de mortalidad con $\sqrt{X+1}$	72
Cuadro 22A.	Transformación de los porcentajes de esporulación con $\sqrt{X+1}$	73

TRABAJO DE GRADUACIÓN
REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ENTOMOLOGÍA DEL
CENTRO GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE
AZÚCAR. – CENGICAÑA -
RESUMEN

El cultivo de la caña de azúcar es el principal producto agrícola generador de divisas al país obteniendo US\$367.68 millones, con un rendimiento de 87,554.54 kg/ha. Éste cultivo ocupa 210,000 ha. en el territorio nacional.

Siendo un cultivo de importancia para el país, se creó en 1992 el Centro de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), el cual tiene como tarea la generación y/o introducción de nuevas tecnologías para mejorar la productividad de la caña de azúcar en Guatemala. CENGICAÑA está compuesto por diferentes líneas de investigación, de las cuales se desprenden los siguientes programas: Programa de Variedades, Programa de Agronomía, Programa de Manejo Integrado de Plagas y Programa de Transferencia de Tecnología y Capacitación. Cada uno de estos programas tiene diferentes áreas, dentro de las que están la de Biotecnología y Entomología.

El área de Biotecnología, es la encargada de aportar herramientas para apoyar al proceso de mejoramiento genético de la caña de azúcar, a través de la propagación *in vitro* de variedades promisorias y actualmente en estudios de la genética de variedades y plagas, a través de marcadores moleculares. Para el plan operativo 2007 de ésta área, fue necesaria la contratación de un estudiante de la Facultad de Agronomía para realizar su Ejercicio Profesional Supervisado, tomando como principales actividades el diagnóstico del área de Biotecnología y la realización de servicios agronómicos contemplados dentro del plan operativo.

En el diagnóstico del área de Biotecnología se plantearon objetivos y determinar así la situación actual del área, contemplando la descripción de la organización dentro de CENGICAÑA, identificación de las funciones, descripción de los proyectos realizados en el período 1997 – 2007, identificación del equipo y material existente en el laboratorio de Biotecnología y detección de las principales necesidades del área.

Los servicios agronómicos desarrollados en el área de Biotecnología son: extracción de ADN genómico de variedades de caña de azúcar, aplicación de la técnica de

microsatélites en ADN genómico de las variedades de caña de azúcar de la colección de trabajo de CENGICAÑA y preparación e implementación de geles de poliácridamida. Además, se realizaron otros servicios los cuales se mencionan al final del documento.

El Programa de Manejo Integrado de Plagas, se realizó el proyecto de investigación, el cual fue titulado: Evaluación de la temperatura sobre la esporulación de entomopatógenos en plagas de la raíz de caña de azúcar en el laboratorio de CENGICAÑA, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla.

Debido a la importancia que han ido tomando los métodos de control biológico para plagas de la raíz de caña de azúcar, se planteó la evaluación de 3 temperaturas y establecer el mayor porcentaje de mortalidad y esporulación que ejercen los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* sp. sobre las plagas de la raíz de la caña de azúcar, *Scaptocoris talpa*, *Dipropus* sp. y *Phyllophaga* sp.

En la investigación se obtuvo el 53% de esporulación de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* sp. Además, las ninfas de *Scaptocoris talpa* superaron con el 41% de mortalidad a las larvas de *Dipropus* sp. y *Phyllophaga* sp. A una temperatura de 25°C se presentó el 39% de esporulación promedio (tomando en cuenta a los dos hongos evaluados) siendo el mejor resultado. Después de realizado el ANDEVA y la prueba de comparación múltiple de medias, se determinó que el tratamiento 10 correspondiente a 25°C, ninfas de *Scaptocoris talpa* inoculadas con *M. anisopliae* obtuvieron la mayor media, indicando el mayor resultado obtenido.

CAPÍTULO I

**DIAGNÓSTICO DEL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO GUATEMALTECO DE
INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR – CENGICAÑA,
SANTA LUCÍA COTZUMALGUAPA, ESCUINTLA.**

1.1 Presentación

El Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar CENGICAÑA, tiene como tarea la generación y/o introducción de nuevas tecnologías para mejorar la productividad del cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. CENGICAÑA fue fundado en 1992, funciona con aportes económicos de los ingenios azucareros, proporcionales a la producción de azúcar, constituyéndose así en un centro de investigación en el país que funciona con fondos privados.

Cada año son definidas y coordinadas las líneas de investigación a desarrollarse por el Comité Técnico Asesor (CTA), conformado por los Gerentes Agrícolas de los ingenios socios al Centro. Estas líneas de investigación se detallan en el plan operativo de los programas que componen CENGICAÑA. Dentro de la organización se tienen los siguientes programas: Programa de Variedades, Programa de Agronomía, Programa de Manejo Integrado de Plagas, Programa de Transferencia de Tecnología y Capacitación. El Programa de Variedades, tiene a su cargo la generación de nuevas variedades de caña de azúcar con el fitomejoramiento tradicional y apoyándose en la Biotecnología para realizarlo de manera más objetiva.

La Biotecnología ha aportado desde 1,996 herramientas para apoyar al proceso de mejoramiento genético de la caña de azúcar, a través de la propagación *in vitro* de variedades promisorias y actualmente en estudios de la genética de variedades y plagas, a través de marcadores moleculares. El área de Biotecnología cuenta con un laboratorio especializado para la propagación *in vitro*, conteniendo salas de crecimiento de condiciones controladas de temperatura, horas luz y humedad relativa. Desde el año 2004, se tienen salas con equipo especializado en marcadores moleculares.

1.2 Marco referencial

1.2.1. Antecedentes

El Área de Biotecnología de CENGICAÑA apoya al Programa de Variedades y al de Manejo Integrado de Plagas a través del aporte de información derivada de estudios de caracterización molecular de organismos. Caracterización molecular de variedades de caña de azúcar de la Colección de Trabajo del Programa de Variedades de CENGICAÑA: CENGICAÑA comenzó a trabajar con marcadores moleculares en el año 2000, por medio de proyectos cooperativos con la Universidad San Carlos de Guatemala y el ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas). A partir del año 2004 se comenzó a Implementar el Laboratorio de Biotecnología con equipo para realizar los estudios en CENGICAÑA. Esto se ha logrado gracias al financiamiento parcial de dos proyectos, por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT (12)

Además, CENGICAÑA forma parte del Consorcio Internacional de Biotecnología para Caña de Azúcar (ICSB por sus siglas en inglés), a través del cual tiene acceso a las aplicaciones más recientes de la Biotecnología en el cultivo (7).

El área de Biotecnología tiene contemplados los siguientes subprocesos dentro del plan operativo:

1. Aplicación de marcadores moleculares en variedades de caña de azúcar.
2. Aplicación de marcadores moleculares en MIP.
3. Importación y evaluación de variedades transgénicas de caña de azúcar.
4. Transformación genética de variedades de caña de azúcar.
5. Participación de ICSB (14).

En el Plan Estratégico 2005 – 2015 se tienen diferentes procesos proyectados, los cuales son:

1. Aplicación de marcadores moleculares para identificación de progenitores.

2. Aplicación de marcadores moleculares para identificación de resistencia genética a Roya (*Puccinia melanocephala*) en variedades de caña de azúcar.
3. Aplicación de marcadores moleculares en MIP.
4. Variedades de caña de azúcar genéticamente modificadas
5. Participación en ICSB (13).

1.2.2. Ubicación del área de Biotecnología

El área de Biotecnología utiliza las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA, el cual se encuentra ubicado a una distancia de 92.5 km de la ciudad de Guatemala, se localiza en las coordenadas 14°19'30'' latitud norte y longitud 91°03'03'', a una altura sobre el nivel del mar de 280 m. Dentro de CENGICAÑA, el área de Biotecnología se encuentra en el edificio 2 (4).

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Describir la situación actual del área de Biotecnología del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA).

1.3.2 Específicos

- 1) Describir la organización del área de Biotecnología del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la caña de azúcar – CENGICAÑA-.
- 2) Identificar las funciones del área de Biotecnología del Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la caña de azúcar – CENGICAÑA-.
- 3) Describir los proyectos realizados en el área de Biotecnología en CENGICAÑA, en el período 1997 - 2007.
- 4) Identificar el equipo y material existente en el Laboratorio de Biotecnología.
- 5) Detectar las principales necesidades del área de Biotecnología.

1.4 Metodología

Con base en los objetivos planteados, se organizó la metodología utilizando herramientas como: entrevistas personales, revisión bibliográfica, compilación de informes realizados por el personal del área y la exploración del laboratorio de Biotecnología.

1.4.1 Entrevistas personales:

Se construyó un modelo de entrevista (cuadro 1), el cual se conformaron las preguntas clave para obtener la mayor información. La entrevista estructura fue realizada a la Biotecnóloga de CENGICAÑA. También, se hizo uso de la entrevista abierta, realizada al Bibliotecólogo, al Fitopatólogo y a un técnico del laboratorio de Entomología.

1.4.2 Revisión bibliográfica

Se realizó la revisión de documentos elaborados por el personal del Programa de Variedades de CENGICAÑA desde el año 1992, los cuales se encuentran en la Biblioteca de CENGICAÑA. Entre los documentos consultados se encuentran:

- Informes anuales de CENGICAÑA desde el año 1992 a 2006. Debido a que el área de Biotecnología inició su equipamiento en el año 1996, no existe información en los años 1992 a 1995. Desde el año 1996 comenzó a tomar importancia al área de Biotecnología.
- Memorias de presentación de resultados desde el año 1994 a 2006.
- Informes anuales de resultados de la revista ATAGUA desde 1994 a 2006.
- Plan Estratégico 2005 – 2015 correspondiente al área de Biotecnología.
- Plan Operativo 2007.
- Tesis de grado.
- Diagnósticos realizados en el laboratorio de Biotecnología.
- Proyectos actuales ejecutados por la Biotecnóloga.

CUADRO 1. Modelo de entrevista.

<p>UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE AGRONOMÍA EJERCICIO PROFESIONAL SUPERVISADO</p> <p>CENTRO DE PRÁCTICA _____ DOCENTE ASESOR _____</p> <p style="text-align: center;">HOJA DE ENTREVISTA No. _____</p> <p>TEMA DE LA ENTREVISTA _____ ENTREVISTADO _____ ENTREVISTADOR _____ OBJETIVO DE LA ENTREVISTA _____ FECHA _____</p> <p style="text-align: center;">INFORMACIÓN</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Cuántos años tiene de laborar en CENGICAÑA? 2. ¿Cuántos años tiene de funcionar el área? 3. ¿Qué función tiene el área? 4. ¿Cuál es la estructura organizacional actual del área? 5. ¿Cómo se definen los proyectos a realizar? 6. ¿Qué instituciones fuera de CENGICAÑA apoyan al área? Y cómo la apoyan? 7. Indique los proyectos que actualmente se están realizando en el área y cuáles son los resultados esperados. 8. Enumere las principales necesidades que actualmente afronta el área, explique cada una de ellas. 9. ¿Cuáles son los proyectos a trabajar en los próximos 5 años? 10. ¿Quiénes han laborado para el área? 11. ¿Cuáles han sido los informes que han realizado estas personas?
--

1.4.3 Compilación de informes realizados por el personal del área de Biotecnología

Con el informe realizado por Ruano (1998) titulado “Informe sobre el avance de actividades en el laboratorio de cultivo de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) de CENGICAÑA”, se obtuvo mayor información acerca del área de Biotecnología. En este informe se describen las actividades realizadas hasta ese año, cuantas plantas se había cultivado, el equipo instalado, los reactivos, etc.

1.4.4 Exploración del laboratorio de Biotecnología

Para identificar el equipo y material existente en el laboratorio, se realizó un recorrido por todos los cuartos del edificio 2. Por cada cuarto, se cuantificó el material y el equipo, además de verificar la función que desempeñaban.

1.5 Resultados

1.5.1 Organización del área de Biotecnología

CENGICAÑA, fue fundado en 1992 y funciona con aportes de los ingenios azucareros de Guatemala, proporcionales a la producción de azúcar. Las líneas de investigación son determinadas con el personal técnico de los ingenios con quienes se desarrolla coordinadamente investigación aplicada y específica.

La Junta Directiva del Centro, está conformada con representante de los ingenios. La coordinación de las actividades de CENGICAÑA está a cargo de la Dirección General. Las actividades técnicas se realizan a través de cuatro programas. Dentro de estos programas se encuentra el Programa de Variedades, el cual tiene las áreas de: Fitomejoramiento, Fitopatología y Biotecnología.

El área de Biotecnología trabajo en la investigación de Micropropagación, Marcadores moleculares y la Participación en el ICSB (2). El área de Biotecnología tiene la siguiente organización.

- Coordinador Programa de Variedades/Fitomejoramiento Ing. Agr. Héctor Orozco
 - Fitomejoramiento Dr. José Luis Quemé
Br. Oscar Castro
Br. Mynor Catalán
 - Fitopatología Ing. Agr. Werner Ovalle
P.A. Salomón García
 - Biotecnología Dra. Andrea Maldonado
 - Estación Experimental T.A. Juan Ramón Oxlej
- (15).

1.5.2 Función del área de Biotecnología

La función del área de Biotecnología es: dar apoyo al área de Fitomejoramiento con el aporte de información genética con análisis de similitud entre variedades que proporciona un elemento para orientar los cruces de plantas de caña de azúcar y al área de Entomología aportando información genética diferenciando las cepas del hongo *Metarhizium* para el control de plagas (11).

1.5.3 Descripción de los proyectos realizados desde 1997 a 2007

La principal actividad que se realizó desde 1996 a 1998 fue el equipamiento del laboratorio de Biotecnología y se iniciaron las actividades de micropropagación. Los trabajos de multiplicación iniciaron con una serie de estudios sobre la validación de protocolos de cultivo *in vitro* de caña de azúcar, control ambiental de los cuartos de transferencia e incubación y la oxidación de variedades comerciales de interés. Se comenzó la micropropagación de plantas de caña de azúcar, pero se encontró alta mortalidad de explantes por contaminaciones bacteriales y fungosas. Luego, se enfatizó el trabajo en el control de calidad en las etapas de micropropagación definiendo las fuentes de mayor contaminación (17).

“Efecto de antioxidantes en el cultivo *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar” (1999). Por ser el coeficiente de multiplicación de la caña de azúcar bajo, se utilizó la micropropagación *in vitro* para aumentarlo en 3 variedades de importancia económica para la determinación hormonal específica. Por tener la caña de azúcar alta producción de compuestos fenólicos que son producto de la oxidación se hizo necesario evaluar antioxidantes que evitaran el problema de la oxidación en la etapa de inicial de los meristemas (3).

“Utilización de marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) para la detección de variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), (2000). Con el objetivo de incrementar los productos heteróticos o de encontrar

variabilidad combinatoria, en un programa de mejoramiento es necesario conocer cuan similares son los genotipos de los progenitores. Para conocer esto los genetistas se han valido de descriptores con los cuales se puede caracterizar y categorizar a una población, dichos descriptores están basados en marcadores genotípicos obtenidos directamente de ADN denominados Marcadores Moleculares. Los marcadores moleculares RAPD han sido utilizados existosamente para detectar la variabilidad que existe en el genoma de la caña de azúcar, utilizando ésta técnicas, se analizaron 39 variedades comerciales con el objetivo de medir la similitud genética que existe entre ellas (5).

“Micropropagación de variedades promisorias de caña de azúcar” (2003). El incremento de material vegetativo de caña de azúcar por el método de siembra de esquejes en campo, para su uso como semilla permite una tasa de multiplicación de 1 a 10 en siete meses, lo cual, es bajo. El uso de técnicas como el cultivo de tejidos permite tasas de multiplicación mayores que en CENGICAÑA han sido del orden de 1 a 14000 en siete meses; además de material vegetativo libre de enfermedades sistémicas. La metodología usada llevó la etapa de preparación de material (colecta del material vegetal, limpieza, desinfección e inducción de germinación) y la de extracción de meristemas (fase de iniciación, multiplicación, enraizamiento, endurecimiento o adaptación) (6).

“Análisis de la similitud genética de 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias Microsatélites de ADN” (2003). Este estudio se realizó en convenio con el ICTA. El objetivo de la investigación fue analizar la similitud genética de 48 variedades por medio de marcadores SSRs para identificar progenitores contrastantes a ser utilizados en los cruzamientos del programa de mejoramiento. Se utilizaron seis pares de primers diseñados por el CIRAD, Francia, para amplificar las regiones microsatélite. Los datos de presencia/ausencia de bandas fueron utilizados para cuantificar la similitud genética con el coeficiente de Dice y análisis de agrupamiento por medio del método UPGMA. De acuerdo a la similitud, los valores entre cada par de variedades variaron de 0.11. Esto indica que existe diversidad entre las 48 variedades. El análisis de agrupamiento detectó 25 grupos con un coeficiente de similitud de 0.28. Los marcadores SSRs constituyen una herramienta útil para análisis de similitud genética de variedades de caña de azúcar (1).

“Procedimiento para el análisis de la relación entre genotipos de caña de azúcar por medio de marcadores moleculares utilizando el paquete computacional NTSYSpc (2005 – 2006). El objetivo era describir el procedimiento para determinar la relación de genotipos utilizando el paquete computacional “Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYSpc)”. El procedimiento describe la caracterización de 48 variedades por medio de secuencias microsatélites del ICTA (16).

“Extracción de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) de Variedades de Caña de Azúcar (2006). El objetivo era evaluar y comparar dos métodos de extracción de ADN de variedades de caña de azúcar de la colección de trabajo del Programa de Variedades de CENGICAÑA. Se utilizaron métodos de extracción de ADN, siendo el de Da Silva y Storchova *et al.*, además de realizar la extracción en material vegetal del mismo día en que se cortaron las plantas y extrayendo con el material congelado 24 horas. Para la extracción, el mejor resultado se dio en el material proveniente de campo y haciendo el procedimiento inmediatamente, también el método de Da Silva demostró ser más rápido y económico (10).

“Evaluación del Método para Extraer ADN de Larvas de Gallina Ciega (Coleóptera : Scarabidae) (2006). El objetivo era evaluar una metodología de extracción de ADN y su utilidad para obtener el material genético de larvas de las especies de Gallina Ciega que afectan al cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. Siendo el método de Graham *et al.*, (1994) con las modificaciones de Millar *et al.*, (1999) es adecuado para extraer ADN de larvas de gallina ciega de las especies que afectan al cultivo de la caña de azúcar en Guatemala, por lo que este método se utilizará en el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA (9).

“Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & P. Syd. (Roya marrón de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Los objetivos fueron seleccionar al menos un marcador AFLP que establezca la condición de resistencia / susceptibilidad a la roya marrón de la caña de azúcar en 10 variedades de la Colección de Trabajo del Programa de Variedades

de CENGICAÑA y Con el análisis AFLP efectuado, determinar la similitud genética de los materiales estudiados. Se seleccionaron dos marcadores AFLP (actcgt9R y aagcta23) que establecen con certeza la condición de resistencia / susceptibilidad a la roya marrón de la caña de azúcar en 10 variedades de la Colección de Trabajo del Programa de Variedades de CENGICAÑA, y la evaluación de la similitud genética de los materiales incluidos en la investigación muestra que las variedades resistentes se congregan en un mismo grupo (8).

1.5.4 Identificación del equipo y material existente en el laboratorio de Biotecnología

El equipo del laboratorio de Biotecnología se ha adquirido con el apoyo de los proyectos realizados con el CONCYT, se detalla a continuación:

CUADRO 2. Equipo del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.

CANTIDAD	EQUIPO
1	Autoclave
1	Balanza analítica
1	Balanza semi-analítica
1	Baño María
2	Cámara de flujo laminar
1	Sistema de fotodocumentación
2	Carretillas
1	Centrífuga
1	Congelador (-20 a -40°C
1	Estufa – agitador
1	Fuente de poder de 300 V y 3000 V
1	Horno microondas
1	Potenciómetro
1	Refrigeradora
2	Tanques de electroforesis horizontal
1	Sistema de ELFO vertical
1	Termociclador
1	Transluminador de luz ultravioleta
1	Regulador de voltaje
	Pipetas de diferentes volúmenes:
1	0.5 – 10 microlitros
1	10 – 100 “
1	100 – 1000 “
1	1000 – 5000 “

Los materiales y los reactivos no se cuantificaron debido a que la cantidad existente de cada uno es variable.

CUADRO 3: Materiales del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.

MATERIALES
Agua desmineralizada
Cristalería graduada
Espátulas
Frascos de vidrio
Gradillas
Guantes
Mascarillas
Microtubos de diferentes volúmenes: 0.2, 0.5, 1.5 y 2 ml
Morteros y pistilo
Papel mayordomo
Parafilm
Pinzas
Pizetas
Puntas para pipetas de diferentes volúmenes: 5 ml, 1000 microlitros, 100 microlitros, 10 mililitros.
Cinta indicadora para autoclave
Termos
Tijeras
Bisturís

CUADRO 4. Reactivos del laboratorio de Biotecnología, CENGICAÑA 2007.

REACTIVOS
3 – (Trimethoxysilyl) Propil methacrylate
Acetato de sódio
Ácido bórico
Ácido cítrico
Acrylamide
Agar gel
Agarosa
Alcohol etílico
Amonium peroxodisulfate
Amonium persulfate
Bromofenol azul
Bromuro de etidio
CTAB: Cetyltrimethyl amonium bromide
Carbonato de sódio

Cloruro de potasio
Cloruro de sodio
D – (+) glucosa
D-sorbitol
Formaldehído
Formamide
Fosfato de potasio
Fosfato de sodio dibásico
MES, low moisture content
Methanol
N,N' - methylene bisacryl – amide
Nitrato de amônio
Pestanal
Polyvinilpyrrolidone
Sal sódica
Sigmacote
Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate
Sulfato de magnesio hepta hidratado
Tetramethylethylene diamine
Thiosulfato de sódio
Tris hidroximetyl aminometano
Tris hydrochloride
Urea
Yeast extract

1.5.5 Detección de las necesidades del área de Biotecnología

Según la entrevista realizada a la Biotecnóloga de CENGICAÑA, la necesidad que tiene el área de Biotecnología es la de contratación de personal capaz de realizar las actividades planteadas en el plan operativo 2007. Debido a esta necesidad, se decidió contratar a un estudiante de la Facultad de Agronomía que esté cursando el Ejercicio Profesional Supervisado. Para el caso del área de Biotecnología necesita capacitar a personal y así seguir ejecutando el plan operativo de los años subsiguientes.

1.6 Conclusiones y Recomendaciones

El área de Biotecnología pertenece al Programa de Variedades de CENGICAÑA, y el trabajo que desarrolla es: Micropropagación, Marcadores moleculares y la participación en ICSB.

La función del área de Biotecnología es: Dar apoyo al área de Fitomejoramiento con el aporte de información genética con análisis de similitud entre variedades que proporciona un elemento para orientar los cruces de plantas de caña de azúcar y al área de Entomología aportando información genética diferenciando las cepas del hongo *Metarhizium* para el control de plagas.

Las investigaciones que se ha desarrollado en el área de Biotecnología son: “Efecto de antioxidantes en el cultivo *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar” (1999), “Utilización de marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) para la detección de variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), (2000), “Micropropagación de variedades promisorias de caña de azúcar” (2003), “Análisis de la similitud genética de 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias Microsatélites de ADN” (2003), “Procedimiento para el análisis de la relación entre genotipos de caña de azúcar por medio de marcadores moleculares utilizando el paquete computacional NTSYSpc (2005 – 2006), “Extracción de Ácido Desoxiribonucleico (ADN) de Variedades de Caña de Azúcar (2006), “Evaluación del Método para Extraer ADN de Larvas de Gallina Ciega (Coleóptera : Scarabidae) (2006), “Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & P. Syd. (Roya marrón de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) (2006).

El área de Biotecnología cuenta con un laboratorio, en el cual se realizan las subproyectos planteados en el plan operativo y plan estratégico para esta área. Dicho laboratorio, cuenta con el equipo necesario para desarrollar las metodologías de micropropagación y marcadores moleculares. Además, cuenta con reactivos y materiales que complementan la elaboración de soluciones, búferes, reacciones químicas, etc.

Para el año 2007, el área de Biotecnología tuvo la necesidad de contratar a un estudiante de la Facultad de Agronomía que cursara el Ejercicio Profesional Supervisado para apoyar en las actividades programadas del plan operativo de esta área, desarrollar e implementar nuevas metodologías necesarias para alcanzar los objetivos y metas planteadas por el área de Biotecnología para este año.

1.7 Bibliografía

1. Aguirre, I. 2003. Análisis de la similitud genética de 48 variedades de caña de azúcar utilizando secuencias microsatélites de ADN. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 70 p.
2. CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, GT). 2005. Organización de CENGICAÑA. Guatemala. 3 p.
3. Cruz, M. 1999. Efecto de antioxidantes en el cultivo *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar. EPSA Informe General de Servicios. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 65 p.
4. _____. 2004. Efecto de la 6-bencilaminapurina en la proliferación de brotes *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 82 p.
5. León, LF. 2001. Utilización de marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) para la detección de variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 63 p.
6. López, E. 2003. Micropropagación de variedades promisorias de caña de azúcar. Guatemala. *In* Memoria de presentación de resultados zafra 2002–2003. Guatemala, CENGICAÑA. p. 53-59.
7. Maldonado, A. 2005. Biotecnología. En: Informe Anual 2005 – 2006. Guatemala, CENGICAÑA. 31 p.
8. _____. 2006a. Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & P. Syd. (roya marrón de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *In* Memoria de presentación de resultados zafra 2005–2006. Guatemala, CENGICAÑA. p. 3-8.
9. _____. 2006b. Extracción de ácido desoxiribonucleico (ADN) de variedades de caña de azúcar. *In* Memoria de presentación de resultados zafra 2005–2006. Guatemala, CENGICAÑA. 44 p.
10. _____. 2006c. Evaluación del método para extraer ADN de larvas de gallina ciega (Coleóptera: Scarabidae). *In* Memoria de presentación de resultados zafra 2005–2006. Guatemala, CENGICAÑA. 49 p.
11. _____. 2007a. Antecedentes, descripción, función, del laboratorio de biotecnología. Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla, Guatemala, CENGICAÑA. 25 p.

12. _____. 2007b. Biotecnología. *In* Informe anual 2006–2007. Guatemala, CENGICAÑA. 28 p.
13. _____. 2007c. Plan operativo del área de biotecnología. Guatemala, CENGICAÑA. 26 p.
14. Maldonado, A; Quemé, L., Ovalle, W., Márquez, M. 2007. Plan estratégico 2010–2015 del área de biotecnología. Guatemala, CENGICAÑA. 16 p.
15. Orozco, H. 2007. Personal profesional y técnico del Programa de Variedades. Guatemala, CENGICAÑA. 5 p.
16. Quemé, L; Melgar, M. 2006. Procedimiento para el análisis de la relación entre genotipos de caña de azúcar por medio de marcadores moleculares utilizando el paquete computacional NTSY Spc. *In* Memoria de presentación de resultados zafra 2005–2006. Guatemala, CENGICAÑA. p. 15-22
17. Ruano, E. 1998. Informe sobre el avance de actividades en el laboratorio de cultivo de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) de CENGICAÑA. Guatemala, CENGICAÑA. 8 p.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ESPORULACIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS EN PLAGAS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.) EN EL LABORATORIO DE CENGICAÑA, SANTA LUCÍA COTZUMALGUAPA, ESCUINTLA.

EVALUATION OF THE TEMPERATURE ON THE SPORULATION OF ENTOMOPATHOGENS OF PEST OF SUGAR CANE ROOTS (*Saccharum* sp.) AT CENGICAÑA LABORATORY, SANTA LUCÍA COTZUMALGUAPA, ESCUINTLA.

2.1 Presentación

El cultivo de la caña de azúcar es el principal producto agrícola generador de divisas al país obteniendo US\$367.68 millones, con un rendimiento de 87,554.54 kg/ha. Éste cultivo ocupa 210,000 ha. en el territorio nacional (21).

Dentro de las pérdidas que tiene el cultivo de la caña de azúcar se encuentran las de plagas de la raíz, las cuales afectan el rendimiento, *Scaptocoris talpa* con 0.053 tm/ha/insecto, *Phyllophaga* sp. con 16.82 tm/ha y *Dipropus* sp. con 29 % y 35% de daño en las variedades CG 72-2086 y CG 96-59, respectivamente. La abundancia de cada especie varía según las condiciones climáticas y tipo de suelo de cada estrato de la zona cañera (11). Estos insectos pueden convivir y causar daño al sistema radicular limitando la conducción vía floema de nutrientes y agua reduciendo así la capacidad de rebrote, vigor de la raíces y el rendimiento de caña de azúcar.

Actualmente, el control a largo plazo del complejo de la raíz se basa en la búsqueda de factores naturales de mortalidad, entre los cuales cabe mencionar los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *Beauveria* spp. Siendo el suelo un hábitat de muchos microorganismos, se hace necesaria la observación de la esporulación de estos hongos entomopatógenos sobre las plagas logrando así la confirmación del control que ejercen sobre estas. Para que se desarrolle la esporulación son necesarios factores ambientales tales como la temperatura con un rango entre 24 a 28° C (14).

En el presente estudio se evaluaron 3 temperaturas: 23° C, 25°C y 27° C para obtener la esporulación de los hongos *M. anisopliae* y *Beauveria* sp. sobre plagas del complejo de la raíz en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Se determinó que con la temperatura de 25°C se obtuvo la mayor esporulación con el 53%.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 PLAGAS DE SUELO QUE AFECTAN LA CAÑA DE AZÚCAR

2.2.1.1 *Scaptocoris talpa* (Hemiptera; Cydnidae)

A este insecto se le conoce como chinche hedionda de la raíz de la caña de azúcar (*Saccharum* spp), fue descrita por primera vez en 1990 de unos especímenes colectados en el departamento de Escuintla, Guatemala. Su distribución se limita a Centro América. En Guatemala está distribuida en los cañaverales de la Costa Sur (11).

Los principales hospederos de *Scaptocoris talpa*, reportados son caña de azúcar (*Saccharum* spp.), pastos (*Brachiaria* spp.) y té de limón (*Cymbopogon citratus*). Encontrándose en estados de ninfa y adulto.

Se desconoce cuál de los últimos estados (ninfa o adulto) es más dañino en afectar la caña de azúcar (10). Afectan el desarrollo normal de las plantas de caña de azúcar, provocando un crecimiento lento y delgado de los tallos, disminuyendo considerablemente el peso de los mismos al succionar los jugos nutritivos de la caña provocando heridas al sistema radicular con la ayuda de su aparato bucal succionador, siendo una vía favorable para el desarrollo de agentes patógenos (11). Las altas infestaciones afectan el desarrollo normal del cultivo de la caña de azúcar, principalmente en la fase de fenológica de desarrollo vegetativo, con una reducción estimada de 1.70 m. en la altura de la planta por ninfa/m² (10). El factor de pérdida en el rendimiento de caña es de 0.053 tm/ha/insecto. El índice de daño de la chinche hedionda es de 6.09 kg. de azúcar/ha/1 insecto/m² (10).

2.2.1.2 *Dipropus* spp. (Coleoptera; Elateridae)

A las larvas comúnmente se conoce como gusanos alambre, nombrados así porque son de cuerpo duro, alargado, cilíndrico y de color café-rojizo, lo cual se asemeja a un pedazo de alambre de cobre o bronce. Los gusanos alambre llegan a ser tan perjudiciales, que destruyen completamente las semillas e impiden su germinación; atacan las raíces, pueden barrenar las partes subterráneas del tallo de las plántulas y facilitan la

entrada de enfermedades en las plantas atacadas. El daño que causa *Dipropus* spp. se establece a partir de 10.48 larvas/m², los daños promedio causados a la raíz, por la familia Elateridae en algunas variedades de caña de azúcar son de 35% (CG 96-59) y de 29% (CG 72-2086), provocando debilitamiento de la planta y en algunos casos la muerte de la misma (11).

2.2.1.3 *Phyllophaga* spp. (Coleoptera; Scarabaeidae)

En Guatemala, se han reportado algunos géneros de *Phyllophaga*, *Anomala*, *Cyclocephala* y *Lingyrus*. Las especies rizófagas estrictas, como sucede con la mayoría de las especies del género *Phyllophaga*, son las que causan daño en los cultivos agrícolas. Las especies de mayor importancia de este género son: *P. menetriesi*, *p. vicina*, *P. elenans* y *P. parvisetis*. Existen variaciones en los hábitos alimenticios, clasificándose en rizófagos (raíces), saprófagos (materia orgánica en descomposición) o facultativa. Los adultos se alimentan de hojas y brotes tiernos, néctar y los botones de las flores. Dependiendo de la especie, el ciclo de vida varía entre 8 y 16 meses; sin embargo, en algunos casos puede llegar hasta 24 meses. Las larvas permanecen en el suelo, especialmente en los primeros 30 cm de profundidad, alimentándose de las raíces de las plantas (11).

El daño se manifiesta con mayor intensidad en los meses de agosto a octubre, cuando las larvas se encuentran en el tercer estadio, que es el más dañino. Los adultos emergen de sus cápsulas pupales en el suelo y aparecen en los campos de cultivo en el período de abril a junio, que coincide con el establecimiento de la época lluviosa, emergen del suelo en forma masiva a copular y ovipositar en grupos de 10 a 14 huevos en el suelo a una profundidad entre 2 y 10 cm. Cada hembra tiene potencial para ovipositar hasta 200 huevos, aproximadamente. Los adultos pueden vivir hasta dos meses y son fuertemente atraídos por la luz artificial, característica que se aprovecha para su captura (11).

La magnitud del daño depende del número de larvas que afecten la caña. Cuando se producen infestaciones severas es frecuente observar grandes cavidades en el interior

de la planta al dejarla desprovista de raíces, se reduce la capacidad de absorción de agua y minerales y por ello se retarda el crecimiento. Las plantas pierden anclaje y el viento o la maquinaria las arranca fácilmente, produciéndose en consecuencia una disminución de la población de tallos en caña de azúcar. Al ocasionar heridas facilita el ingreso de agentes infecciosos como hongos, bacterias y nematodos (10).

El daño que provocan representa un factor limitante para la producción de caña de azúcar, causando un efecto negativo sobre la altura y rendimiento de la caña de azúcar al tener una población crítica más allá de 10 larvas/m² de *Phyllophaga* sp. y debe considerarse como una estimación preliminar que establece un índice de pérdida de 0.88 tm/ha producido por cada incremento de 1 larva/m² en campo (16). En producción de azúcar, el índice de daño de la gallina ciega es de 70.91kg. de azúcar/ha/larva/m², reduciendo la altura de la planta en 4.8% y en el rendimiento de 16.82 tm/ha (16%). El coeficiente de pérdida es de 0.62 tm/ha por cada larva/ m² (18).

2.2.2 CONTROL BIOLÓGICO DE LAS PLAGAS DE LA RAÍZ

Las investigaciones de otros países indican que el control biológico de tipo microbial tiene mayor probabilidad de éxito, en un futuro cercano. En los estudios sobre los factores de mortalidad, se han identificado varios agentes causales como: *Bacillus popilliae*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brogniartii*, Nematodos del orden *Rhabditida* y algunos parasitoides. Sin embargo, *Bacillus popilliae*, parece ser el de mayor incidencia natural y el de mayor importancia (19).

Los patógenos de insectos en general están llegando rápidamente a ser importantes instrumentos para la supresión de plagas insectiles. Formulaciones comerciales de bacterias y virus que causan enfermedades altamente específicas están disponibles en el mercado. Trabajos sobre nematodos, hongos y otros patógenos son prometedores (19), hasta el momento se han registrado 40 géneros de hongos entomopatógenos, sin embargo sólo unos se han investigado intensivamente, siendo *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Coelomomyces*, *Cordyceps*, *Nomuraea*, *Aschersonia*, e *Hirsutella*.

El hongo *Beauveria bassiana*, tiene una lista amplia y variada de especies de insectos parasitados. El Deuteromyceto *Metarhizium* sp. se está utilizando como insecticida microbial para reducir las poblaciones de *Scaptocoris talpa*, *Dipropus* sp. y *Phyllophaga* sp. en la región cañera de Guatemala y se utiliza comercialmente en varios países productores de caña de azúcar (14). Según Márquez (16) un estudio realizado a nivel de laboratorio con *Metarhizium anisopliae* sobre chinche hedionda, obtuvo mortalidades de 64.81% sobre ninfas. Montepeque et al., (23) un estudio realizado a nivel de laboratorio determinaron que la mejor dosis de *M. Anisopliae* es de 21.40 Kg./ha, con una mortalidad del 40% en larvas de gusano alambre.

Badilla et al., (5) determinaron que el control de la chinche hedionda se ha realizado con productos químicos al momento de la siembra y es la única aplicación que se realiza durante 5 ciclos de cultivo de caña de azúcar, hasta la fecha no se ha registrado efecto de control. Es por esto que el manejo de ésta plaga debe ser con el concepto integrado para poder reducir las poblaciones a niveles que no causen problema económico, cobra mucha importancia el uso de tácticas como los entomopatógenos tal es el caso de *M. anisopliae*. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir en las condiciones donde habita la chinche hedionda y por lo tanto el control puede ser estable en el largo plazo (2).

2.2.3 HONGOS *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* spp. COMO CONTROL DE PLAGAS DE LA RAÍZ DE LA CAÑA DE AZÚCAR

A continuación se describen algunos estudios relacionados con el control biológico del complejo de plagas de la raíz con los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* spp.

2.2.3.1 *Beauveria* spp.

2.2.3.1.1 *Scaptocoris talpa*

En un estudio realizado por Márquez, J. M. (2005), con el propósito de identificar agentes de control microbiológico para reducir la dependencia de productos químicos, se

evaluaron 10 cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria* spp., en el cual se evidenció que existe una diferente capacidad de infección de las cepas y que las de mayor potencial de uso en el futuro son: BB2D, 1072, Agrícola el Sol, 1071 y 1067, las que presentaron un promedio de parasitismo de 54, 36, 30, 30 y 28 %, respectivamente. En el estudio se observó parasitismo a partir de la mortalidad a través del tiempo y la confirmación de la presencia del hongo mediante la esporulación en cámara húmeda individual.

2.2.3.1.2 *Dipropus* spp.

En el estudio titulado “Evaluación de productos biológicos comerciales para el control de plagas de la raíz”, en el cual se obtuvieron parasitismos de 35 y 45% para *Beauveria* spp. En este estudio se revisaron las larvas de las unidades experimentales y se colocaron en cámaras húmedas hasta registrar el número de larvas con signos de esporulación del hongo aplicado (25).

Tomando en cuenta los resultados del estudio realizado para evaluar la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria* spp., en las plagas de la raíz. Se obtuvieron mortalidades del 50% en el género *Agriotes* sp. (Col: Elateridae) (19).

2.2.3.1.3 *Phyllophaga* spp.

Tomando los resultados del estudio anteriormente descrito en donde se evaluó la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria* spp., para el caso de *Phyllophaga* spp. también se obtuvieron mortalidades que superan el 50% (19).

2.2.3.2 *Metarhizium anisopliae*

2.2.3.2.1 *Scaptocoris talpa*

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de 7 cepas de *M. anisopliae* y 2 nematodos entomopatógenos para el control del complejo de plagas de la raíz. Al realizar el análisis del porcentaje de reducción de insectos/m² la cepa de *M. anisopliae* (CG 93-3)

mostró el valor más alto con un 91.43%, seguido de la cepa de *M. anisopliae* (472) con un 78.37%. Según Márquez (19), las cepas que tienen reducciones mayores al 70% se consideran ideales para continuar pruebas en campo.

2.2.3.2.2 *Dipropus* spp.

En el estudio titulado “Evaluación de productos biológicos comerciales para el control de plagas de la raíz”, se obtuvieron datos de parasitismo del 56% de *M. anisopliae*, siendo el mejor tratamiento del ensayo. *Dipropus* spp. puede obtener estos porcentajes de parasitismo debido a la cantidad de espacios intersegmentales en el cuerpo y que sirven de ingreso a las hifas del hongo (25).

2.2.3.2.3 *Phyllophaga* spp.

Tomando el estudio realizado para evaluar productos biológicos comerciales para el control de plagas de la raíz, el mejor resultado lo obtuvo *Metarhizium anisopliae* con un parasitismo del 16%. Entre las conclusiones del estudio, se indica que ningún producto comercial fue significativamente superior. Los valores de parasitismo fueron muy bajos con rango entre 0 y 16% (25).

El estudio de la evaluación de 7 cepas de *Metarhizium anisopliae* y 2 nematodos entomopatógenos para el control de *Phyllophaga* spp., se tomaron datos de la reducción de la población (larvas/m²) en porcentaje, siendo este del 62% para el tratamiento testigo (sin control), y 5 tratamientos correspondientes al hongo *M. anisopliae* (20).

2.2.4 FACTORES QUE AFECTAN LA VIRULENCIA DE LOS AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

Existen varios factores que afectan la virulencia desarrollo y esporulación de los agentes de control biológico como: el sustrato de crecimiento, viabilidad y concentración de conidios, la dieta del huésped, la luz, productos químicos, humedad y la temperatura,

pues la mortalidad de la plaga disminuye a medida que la temperatura aumenta, en temperaturas altas, aunque el hongo entomopatógeno sobrevive, tiene un control muy bajo por lo que son necesarias cepas que sean efectivas en esas condiciones (14).

La temperatura tiene un efecto mayor en todas las actividades celulares y es uno de los principales factores que limitan a los hongos entomopatógenos. Por debajo de 0° C los hongos generalmente sobreviven, pero raramente crecen, y arriba de los 40° C la mayoría de los hongos detienen su crecimiento y mueren rápidamente. Dentro de este rango, el crecimiento de los hongos puede aumentar o bien disminuir dependiendo del aislamiento, la especie y la temperatura. Sin embargo, dentro de una misma especie los rangos son muy variables y los óptimos se distribuyen de manera muy diferente entre las cepas de hongos, por ejemplo: *M. anisopliae* el 33% de los aislados se desarrolla dentro del rango de 8-11°C y 35-37° C, pero tiene un notable crecimiento a 35° C, otras cepas se desarrollan en el rango de 11 - 32° C y temperaturas menores o iguales a 25° C estimulan mayor crecimiento, muy similar es el caso de *B. bassiana*, cuyo rango es de 8 - 32° C y el óptimo a los 30° C (14).

De manera semejante, la temperatura también influye en la patogenicidad de los hongos con temperaturas que fluctúan entre 20 - 30° C. La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos no necesariamente es la misma que para el desarrollo de la enfermedad. De manera semejante, el porcentaje de infección por hongos entomopatógenos está relacionado directamente con la temperatura.

Las temperaturas bajas provocan que el tiempo de desarrollo del entomopatógeno sea mucho mayor dentro del huésped, retardan de manera significativa la micosis sin afectar la mortalidad (14). Uno de los factores que afecta la virulencia es el tipo de sustrato de crecimiento donde se desarrollan sus esporas. Otro factor es la temperatura que cambia la virulencia, pues *B. bassiana* es virulenta a 25° C, menos virulenta a 15° C y 35° C o aún si se presenta la infección y producción de hifas, no se forman apresorios. El utilizar concentraciones conocidas de conidios ayuda a definir las diferencias en mortalidad de los inmaduros bajo estudio (14).

2.2.5 EFECTO DE LOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

La luz, temperatura, humedad, sustrato y productos químicos influyen en la estabilidad, sensibilidad y persistencia en las etapas de desarrollo de los hongos entomopatógenos. Estos factores afectan tanto en forma independiente o colectivamente a los hongos que se presentan en forma natural y a los que se introducen como agentes de control biológico, como también afecta el crecimiento y sobrevivencia de los hongos directa o indirectamente vía su hospedero y generalmente, los efectos difieren entre las diferentes especies de hongos (3).

2.2.6 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS

La temperatura, es un factor muy importante en la preservación de cultivos de hongos seleccionados, ya que los especímenes después de 18 meses de almacenaje llegan a ser activos, normales cuando son cultivados inmediatamente después del deshielo. Este factor tiene efecto directo en la germinación, crecimiento y predominio en las especies utilizadas en el control biológico, para superar a las temperaturas altas, se ha tenido que seleccionar cepas capaces de vivir a temperaturas mayores a 36° C. La respuesta de crecimiento ante la temperatura varía considerablemente entre aislamientos y especies de hongos entomopatógenos con crecimiento óptimo entre 20 y 32° C. La influencia de la temperatura sobre el crecimiento *in vitro* de las principales especies de hongos Hyphomycetes entomopatógenos han sido estudiados con 31 aislamientos de hongos: tres cepas de *B. bassiana*, tres cepas de *B. brongniartii*, ocho de *M. anisopliae*, una cepa de *M. flavoviride*, seis cepas de *Nomuraea rileyi* y ninguna cepa de *Phacelomyces* sp. para determinar la influencia de la temperatura en los porcentajes de crecimiento y rangos de crecimiento a diez niveles constantes de temperaturas comprendidas entre 8 y 37° C (cuadro 5) (14).

CUADRO 5: Rangos de temperatura sobre hongos *Metarhizium* y *Beauveria*.

ESPECIE	T° DE CRECIMIENTO	T° ÓPTIMA	RANGO T° MORTAL
<i>Metarhizium flavoviride</i>	11 - 32°C	25 - 32°C	<10°C y >33°C
<i>Metarhizium anisopliae</i>	8°C - 37°C	25°C - 32°C	<7°C y > 38°C
<i>Beauveria bassiana</i>	8°C - 35°C	28°C y 30°C	<7°C y >36°C

Fuente: González, 2003.

2.2.7 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PATOGENICIDAD DE LOS HONGOS.

La temperatura óptima para el crecimiento de los hongos no necesariamente es la misma que para infectar a los insectos, estos valores toman gran significado si se toma en cuenta que las temperaturas menores al valor óptimo retardan de manera significativa el desarrollo de la micosis sin afectar necesariamente la mortalidad total y cambios de 4° C, están asociados con restricciones en la enfermedad que varía de 15 a 100%. La rapidez del desarrollo del micelio y por consiguiente el de la evolución de infección, depende de la temperatura. Además, las lesiones producidas por el patógeno se desarrollan en todas las condiciones ambientales pero son mayores a 24 y 28° C.

Debe tomarse en consideración la influencia de la temperatura sobre el insecto hospedero, puesto que períodos muy cortos entre mudas, producto de altas temperaturas, pueden reducir por ejemplo, la duración del estadio en tal medida que impide la penetración del hongo a través del tegumento, además implican la termorregulación del huésped. Además, el porcentaje de germinación de los conidios, se ve afectado por la temperatura, pocas veces se presenta una germinación total de 97 - 100% en todas las temperaturas. Los aislamientos de hongos muestran una gran diversidad de respuestas con respecto a la temperatura de acuerdo a su procedencia, por lo que su rango de temperatura son variables. Los aislamientos de origen tropical crecen en forma considerable a 35° C y los que se originan a partir de insectos que habitan en suelos en áreas templadas exhiben porcentajes de crecimiento muy altos a 8° C (26).

2.3 Objetivos

General:

Evaluar tres temperaturas sobre la esporulación de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*. y *Beauveria* spp. aplicados tópicamente en inmaduros de *Scaptocoris talpa*, *Phyllophaga* sp. y *Dipropus* spp., a nivel de laboratorio.

Específicos:

1. Establecer la mortalidad de las larvas de *Phyllophaga* spp. y *Dipropus* spp. y ninfas de *Scaptocoris talpa* con la aplicación de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* spp.
2. Determinar la temperatura que obtenga mayores porcentajes de esporulación de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* sp.

2.4 Hipótesis

1. El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* tendrá una esporulación promedio del 33% en larvas de gallina ciega y gusano alambre, y ninfas chinche hedionda.
2. El hongo entomopatógeno *Beauveria* spp. tendrá una esporulación arriba del 28% en larvas de gallina ciega y gusano alambre, y ninfas chinche hedionda.
3. La mortalidad de ninfas de chinche hedionda será mayor del 40% con respecto a las larvas de gallina ciega y gusano alambre.

2.5 Metodología

2.5.1 METODOLOGÍA PARA ESTABLECER LA MORTALIDAD DE LAS PLAGAS EVALUADAS

2.5.1.1 TRATAMIENTOS

Se evaluaron 9 tratamientos para la variable mortalidad, que se describe en el cuadro 6.

CUADRO 6. Tratamientos evaluados para la variable mortalidad.

Tratamiento 1	A1B1
Tratamiento 2	A1B2
Tratamiento 3	A1B3
Tratamiento 4	A2B1
Tratamiento 5	A2B2
Tratamiento 6	A2B3
Tratamiento 7	A3B1
Tratamiento 8	A3B2
Tratamiento 9	A3B3

Donde:

CUADRO 7. Factores evaluados para la mortalidad.

FACTOR A		FACTOR B	
A ₁	Ninfa de <i>Scaptocoris talpa</i>	B ₁	<i>Metarhizium anisopliae</i>
A ₂	Larva de <i>Phyllophaga sp.</i>	B ₂	<i>Beauveria bassiana</i>
A ₃	Larva de <i>Dipropus spp.</i>	B ₃	Agua esterilizada

2.5.1.2 DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

2.5.1.2.1 INMADUROS

Se utilizaron larvas de *Phyllophaga* sp. y *Dipropus* spp. y ninfas de *Scaptocoris talpa* de la misma respectivamente. Las larvas y las ninfas fueron colectadas en áreas del cultivo de la caña de azúcar que presentan infestaciones altas o arriba del umbral de 10.48 larvas/m² para *Dipropus* sp., 50 insectos/m² para *Scaptocoris talpa* y 10 larvas/m² para *Phyllophaga* sp.

2.5.1.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

Esta estuvo compuesta por 5 inmaduros correspondientes a cada plaga, colocados dentro de una caja petri para la toma de los datos de mortalidad y esporulación (figura 1).



Figura 1. Unidad experimental en donde se observan larvas de *Dipropus* sp. dentro de una caja petri

2.5.1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar debido a que las condiciones ambientales estuvieron controladas dentro del laboratorio, con arreglo combinatorio bifactorial para la variable mortalidad.

El modelo estadístico asociado a esta variable fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = porcentaje de mortalidad en la ij -ésima larva y ninfa de las plagas.

μ = media general

α_i = efecto de la i -ésima plaga

β_j = efecto del j -ésimo hongo

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre la i -ésima plaga y el j -ésimo hongo.

ξ_{ijk} = error experimental asociado a la ijk -ésima larva o ninfa de las plagas.

Para esta variable se evaluaron 9 repeticiones.

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio trifactorial para la variable esporulación.

El modelo estadístico asociado a esta variable se detalla a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \theta_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\theta)_{ik} + (\beta\theta)_{jk} + (\alpha\beta\theta)_{ijk} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = porcentaje de esporulación en la ijk ésima larva y ninfa de las plagas.

μ = media general

α_i = efecto de la i -ésima temperatura

β_j = efecto de la j -ésima plaga

θ_k = efecto de la k -ésimo hongo

$(\theta\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre la i-ésima temperatura y la j-ésima plaga

$(\alpha\theta)_{ik}$ = efecto de la interacción entre la i-ésima temperatura y la k-ésimo hongo.

$(\beta\theta)_{jk}$ = efecto de la interacción entre la j-ésima plaga y la k-ésimo hongo

$(\alpha\beta\theta)_{ijk}$ = efecto de la interacción entre la i-ésima temperatura, la j-ésima plaga y el k-ésimo hongo.

ξ_{ijk} = error experimental asociado a la ijk-ésima larva o ninfa de las plagas.

Para esta variable se utilizaron 3 repeticiones.

2.5.1.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO

2.5.1.5.1 COLECTA DE LOS INMADUROS

Los inmaduros provinieron de las siguientes fincas: Las Delicias para *Scaptocoris talpa*, El Bálsamo para *Phyllophaga* spp. y Buganvillas para *Dipropus* sp. (Figura 13A).

2.5.1.5.2 CLASIFICACIÓN DE LOS INMADUROS

Después de la colecta, los inmaduros se introdujeron en macetas con plántulas de arroz, previamente sembradas (Figura 14A). Después de 8 días de estar alimentándose de las raíces de las plántulas de arroz se tomaron los inmaduros y se observó la debilidad, esporulación contaminante y daño. Los inmaduros que presentaron estas características fueron desechados y solamente se llevaron al laboratorio los inmaduros vigorosos y sin signos o síntomas de parasitismo de algún microorganismo.

2.5.1.5.3 MANEJO DE LOS INSECTOS EN EL LABORATORIO

Luego de la clasificación de los inmaduros, se trasladaron al laboratorio para su inoculación. A continuación se describen los pasos:

1. Se lavaron los inmaduros para eliminar restos de suelo y raíces. Para este paso se utilizó un colador convencional, se roció agua estéril y sulfato de cobre (2%) por

encima de los insectos. Posteriormente se secaron dentro de una caja de petri conteniendo papel toalla estéril.

2. Se realizaron 150 ml de la concentración de los hongos entomopatógenos, *M. anisopliae* cepa NB y *Beauveria*. sp. cepa 1067. A través de una estufa agitadora se obtuvieron las conidias esporuladas en arroz (producción almacenada a 4°C) y con la ayuda de la cámara de Newbawer se realizó el conteo de conidias/ml. Por medio de la fórmula de $C1 \times V1 = C2 \times V2$, se calculó el volumen de la solución con conidias requerido para la concentración final, siendo esta de 1×10^8 .
3. Al tener a los inmaduros secos y la concentración de los hongos, se procedió a la inoculación de los mismos dentro de una cámara de flujo laminar previamente desinfectada. En una caja de petri se vertieron 50 ml de la concentración, con una pinza se introdujeron los inmaduros en la caja petri y por inmersión durante 1 min. fueron infectados con los hongos. Cabe resaltar que los inmaduros fueron inoculados con los hongos por separado. Primero se utilizó el hongo *M. anisopliae*, luego se desinfectó la cámara de flujo laminar y por último se utilizó el hongo *Beauveria* sp. Después de la inmersión, los inmaduros fueron trasladados a cajas de petri conteniendo papel mayordomo estéril. Una caja de petri representó la unidad experimental, o sea que tenía a los 5 inmaduros correspondientes.
4. Dentro de una sala con temperatura controlada fueron dejadas la cajas de petri con los inmaduros inoculados. En este momento se tomaron las 6 lecturas de mortalidad. Según Ovalle y Alemán (24), la mortalidad de ninfas de *Scaptocoris talpa Aenolamia postica* inoculadas con *M. anisopliae* se logra al transcurrir 4 a 5 días después de la inoculación, o al morir. Por su parte, Meneses y Echeverría (22), logró mortalidades del insecto *Lissorhoptrus brevisrostris* (Col.; Curculionidae) a los 4 días posteriores a la inoculación con *M. anisopliae*.

2.5.2 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LA TEMPERATURA CON LOS MAYORES PORCENTAJES DE ESPORULACIÓN DE LOS HONGOS EVALUADOS

1. Establecimiento de la mortalidad de las larvas de *Dipropus* sp. y *Phyllophaga* sp. y ninfas de *Scaptocoris talpa* a partir de la cuantificación de los inmaduros muertos por unidad experimental.
2. Desinfección de los inmaduros muertos a través de una solución de agua estéril y cloro al 2%. Esta desinfección se realizó con 3 cajas petri colocadas de la siguiente manera: la primera con agua estéril, la segunda con cloro 2% y la tercera con agua estéril para eliminar el cloro residual. Esta desinfección se desarrolló para eliminar algún organismo patógeno en el cuerpo del inmaduro.
3. Luego, los inmaduros muertos fueron colocados dentro de cámaras húmedas. Dichas cámaras húmedas estuvieron hechas con papel mayordomo cortado a la medida de una caja petri y en donde los inmaduros fueron puestos sobre portaobjetos alineados en forma de cruz.
4. Al tener la cámara húmeda hecha, se introdujeron dentro de incubadora a una temperatura de 23°C, 25°C o 27°C, según el tratamiento correspondiente. En la incubadora se tomaron las lecturas de esporulación hasta el día 5. Ovalle y Alemán (24), mencionan que la esporulación del hongo *M. anisopliae* sobre ninfas de chinche salivosa *A. postica* ocurre regularmente entre los 4 a 7 días después de colocados en las cámaras húmedas.

2.6 Resultados

2.6.1 MORTALIDAD

Los resultados de mortalidad (cuadro 8) fueron tomados en porcentaje, representando el 20% cada inmaduro en la unidad experimental (figura 1).

CUADRO 8: Porcentajes de mortalidad por tratamiento, laboratorio de CENGICAÑA, 2007.

TRAT.	DESCRIPCIÓN	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	PROMEDIO
T1	Ch. – Met.	40	80	40	80	100	60	60	40	100	67
T2	Ch. – Beauv	40	40	100	60	80	100	60	80	60	69
T3	Ch. – agua	20	0	0	20	20	0	20	0	0	9
T4	Gall. – Met.	20	0	100	80	60	60	80	20	20	49
T5	Gall – Beauv	20	40	0	40	60	80	60	100	20	47
T6	Gall – agua	20	0	0	20	0	0	0	0	0	4
T7	Gus al – Met.	60	80	40	60	100	100	40	100	80	73
T8	Gus al – Beauv	40	40	60	40	60	80	40	40	100	56
T9	Gus al - agua	20	0	40	0	40	0	0	0	0	11

Los resultados contenidos en el cuadro 4, representan la sumatoria por cada repetición de las 6 lecturas realizadas para la variable mortalidad. Los datos anteriores no tienen ninguna transformación.

Los porcentajes de mortalidad tuvieron resultados entre 0 y 100%. El tratamiento que obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad sin transformación fue el T7 con un 73%, correspondiente a *Dipropus* spp. e inoculados con *M. anisopliae* (Figura 3.)



Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* sp. y *Dipropus* spp.

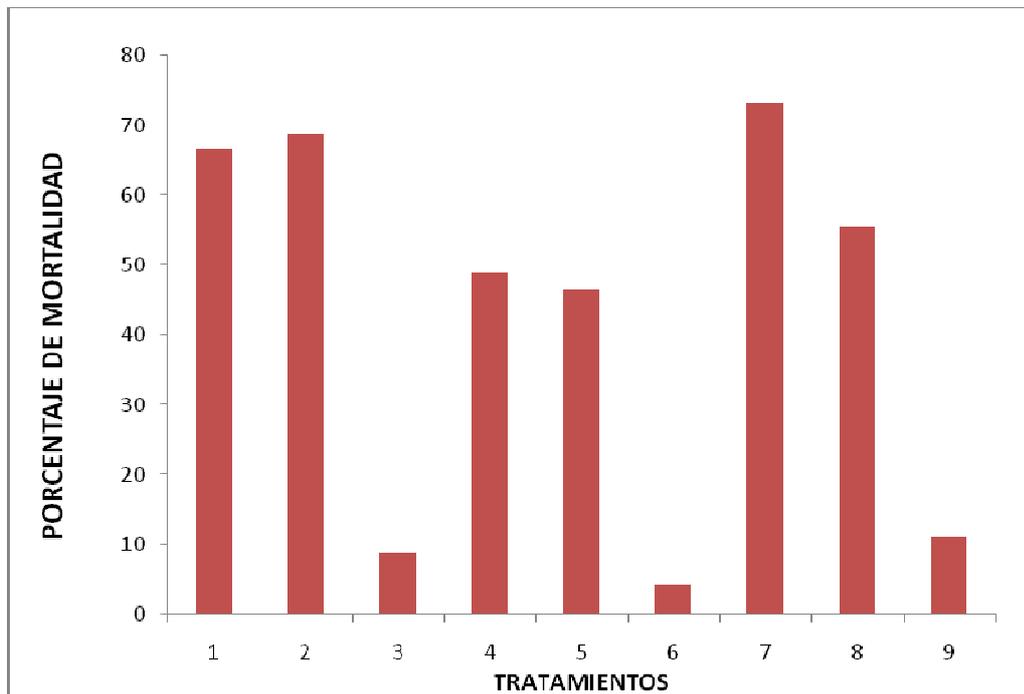


Figura 3: Porcentaje de mortalidad promedio hasta el día 6 después de inoculación de los inmaduros con los hongos entomopatógenos evaluados.

Debido a que los inmaduros tratados con el factor de corrección (agua estéril) presentaron mortalidad, se utilizó la fórmula de Abbott:

FÓRMULA DE ABBOTT:

$$\frac{\% \text{ mort. promedio con hongo} - \% \text{ mort. promedio sin hongo}}{100 - \% \text{ mort. promedio sin hongo}}$$

$$100 - \% \text{ mort. promedio sin hongo}$$

Cuadro 9. Resultados de porcentaje de mortalidad ajustados con la fórmula de Abbott.

TRAT	DESCRIPCIÓN	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	PROMEDIO
T1	Ch. – Met.	25	80	40	75	100	60	50	40	100	63
T2	Ch. – Beauv	25	40	100	50	75	100	50	40	60	69
T3	Ch. – agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	Gall. – Met.	0	0	100	75	60	60	80	20	20	46
T5	Gall – Beauv	0	40	0	25	60	80	60	100	20	43
T6	Gall – agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	Gus al – Met.	50	80	0	60	100	100	40	100	80	68
T8	Gus al – Beauv	25	40	40	40	40	80	40	40	100	48
T9	Gus al - agua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Al efectuar la transformación con la fórmula de Abbott, se observan variaciones en los resultados del porcentaje de mortalidad por cada repetición y en el promedio. Con la aplicación de la fórmula de Abbott, el tratamiento que obtuvo el mayor resultado fue el T2 con un 69%, correspondiente a ninfas de *Scaptocoris talpa* inoculadas con *Beauveria* sp.

Anteriormente, el tratamiento que presentó mayor resultado fue el T7 con un 73%. Al realizar la transformación con la fórmula de Abbott disminuyó el porcentaje de mortalidad promedio para este tratamiento, debido a que existió mortalidad en el tratamiento T9, siendo este, el factor de corrección.

Para determinar si se deberían transformar los resultados de porcentaje de mortalidad, se realizó la prueba de Barlett citada por López, E. (15) para verificar la homogeneidad de varianzas (cuadro 19A). Además se realizó la grafica de los residuos, observándose la tendencia (figura 4).

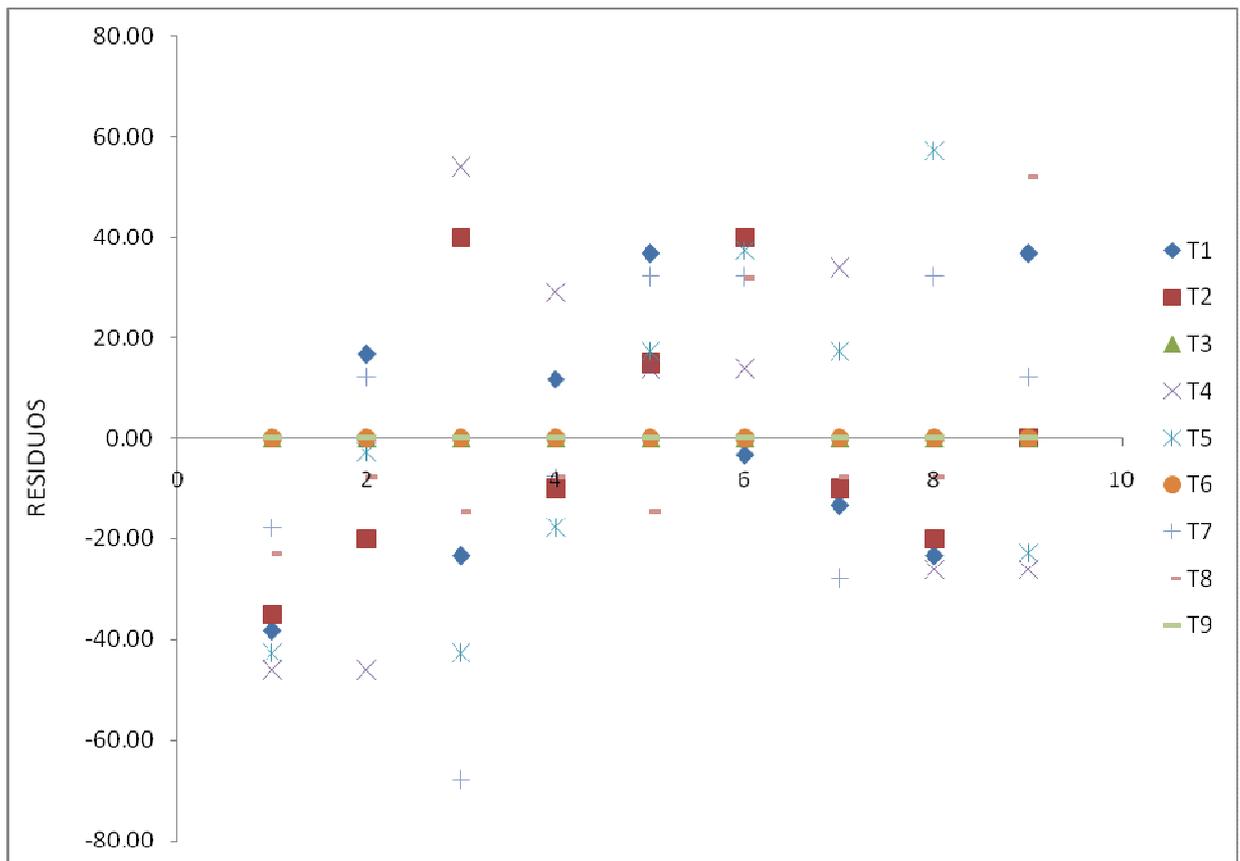


Figura 4. Residuos para la variable mortalidad.

La prueba de Barlett de los porcentajes de mortalidad no transformados tuvo los siguientes resultados:

$$H_0 = \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \dots \sigma^2_i$$

$$H_a = \sigma^2_i \neq \sigma^2_i, \text{ para algùn } i = i' \quad \chi^2_o = 7675.94, \mathbf{X(8,0.05)} 15.507.$$

Regla de decisión: H_c mayor que $H(8, 0.05)$, se rechaza la H_0 la cual indica que todas las varianzas son homogéneas por lo que no hay homogeneidad de varianzas, por

lo que se realizó transformación de los porcentajes de mortalidad (figura 5) y (cuadro 21A). La transformación de los datos se hizo con la fórmula $\sqrt{X+1}$.

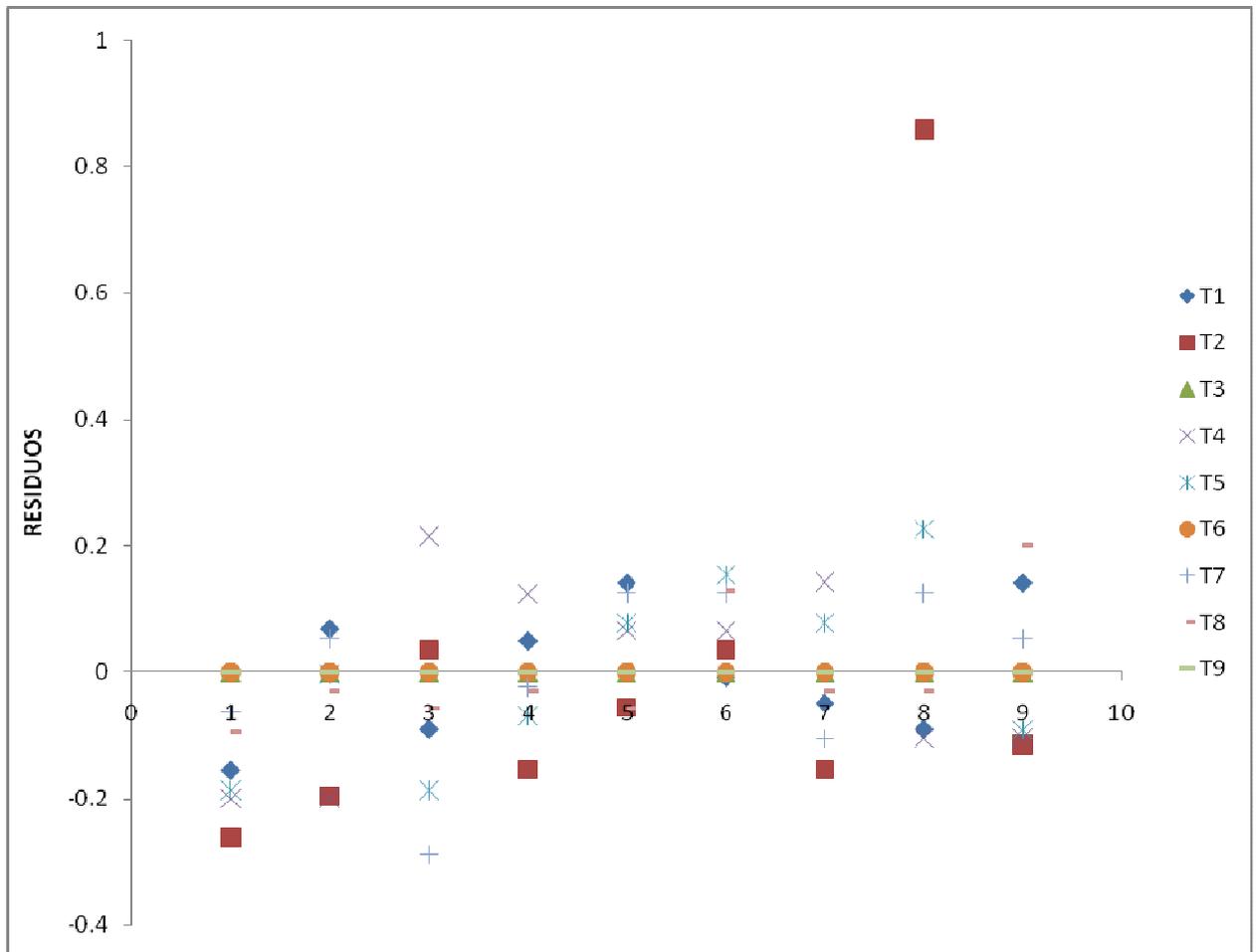


Figura 5. Residuos transformados para la variable mortalidad.

La prueba de Barlett de los porcentajes de mortalidad transformados tuvo los siguientes resultados:

$$H_0 = \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \dots = \sigma^2_i$$

$$H_a = \sigma^2_i \neq \sigma^2_i, \text{ para algún } i = i' \quad \chi^2_o = -5106.40, \mathbf{X(8,0.05)} 15.507.$$

Regla de decisión: H_c menor que $H(8, 0.05)$, se acepta la H_0 la cual indica que todas las varianzas son homogéneas por lo que existe homogeneidad de varianzas.

Cuadro 10. Porcentaje de mortalidad promedio para los inmaduros de las plagas evaluadas con la transformación de Abbott.

	<i>Scaptocoris talpa</i>	<i>Phyllophaga</i> sp.	<i>Dipropus</i> sp.	PROMEDIO
<i>M. anisopliae</i>	63	46	68	59
<i>Beauveria</i> sp.	60	43	48	50
Agua estéril	0	0	0	0
PROMEDIO	41	30	39	

Fuente: Ebert. 2007.

Las ninfas de *Scaptocoris talpa* presentaron el 41% de mortalidad promedio, al compararse con las larvas de *Phyllophaga* sp. y *Dipropus* sp., obtuvo el mayor resultado. Barrios (6) obtuvo resultados de 27.60% y 18.80% de mortalidad promedio de la chinche hedionda utilizando como control biológico a los nematodos *Heterorhabditis* spp. y *Diplogasteritus* spp, respectivamente.

Las larvas de *Phyllophaga* sp obtuvieron el 30% de mortalidad promedio. Díaz (12), indica que Poprawski y Yule (1991), mencionan que larvas del segundo y tercer estadio de *Phyllophaga* sp. alcanzaron mortalidades del 24% ocasionadas por hongos entomopatógenos. Siendo este estudio un comparador de los resultados, los cuales se encuentran arriba de la mortalidad alcanzada por dichos investigadores.

Por su parte, las larvas de *Dipropus* sp. manifestaron el 39% de mortalidad promedio. En el estudio realizado para evaluar la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre larvas de gusano alambre se obtuvieron mortalidades entre el 1.54% hasta del 80% (9).

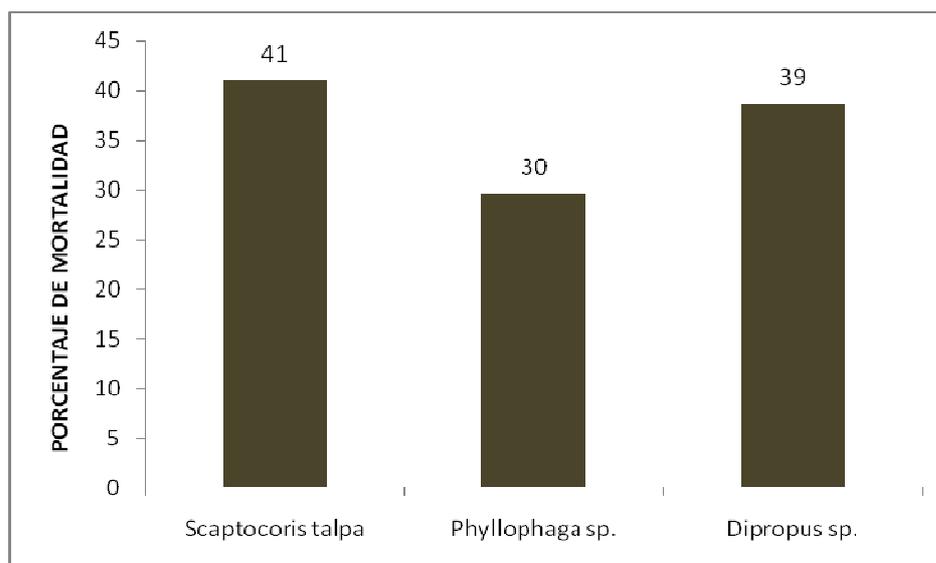


Figura 6. Comportamiento de la mortalidad de los inmaduros de las plagas evaluadas.

El factor agua estéril, hace referencia al factor de corrección incluido en el estudio para determinar que la mortalidad de los inmaduros sería por acción de los hongos entomopatógenos y no por algún otro factor, aunque se obtuvo el 8% de mortalidad pudiendo ser por mal por muerte natural.

M. anisopliae ejerció el 59% de mortalidad sobre los inmaduros evaluados, obteniendo el mayor porcentaje. En el estudio hecho por Berlanga y Hernández (7) para determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *M. anisopliae* en *Schistocerca piceifrons piceifrons* (Orth.; Acrididae), obteniendo del 76% al 88%. Cepas de *M. anisopliae* alcanzaron porcentajes de mortalidad del 54%, 60% y 70% en el cuarto y quinto día después de su inoculación sobre adultos de chinche salivosa (*Aenolamia* sp.) (8).

Con el hongo *Beauveria* sp., se alcanzó el 50% de mortalidad sobre los inmaduros de las plagas evaluadas. Badilla y Alves (4) evaluaron bajo condiciones de laboratorio y campo el control con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vaurie (Col.: Curculionidae) presentando el 34.4%, 36.1% y 74.6% de mortalidad en adultos de picudo con una dosis del hongo de 4.9×10^{11} conidios a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Berlanga y Hernández (7) obtuvieron resultados de mortalidad promedio acumulada al sexto día de inoculación del hongo de 17.87%, 76.43%

y 88.14% en adultos de *Schistocerca piceifrons piceifrons* a una temperatura de 26°C en condiciones controladas de laboratorio. Tomando estos estudios como referencia, los resultados obtenidos dentro de los rangos de mortalidad mencionados.

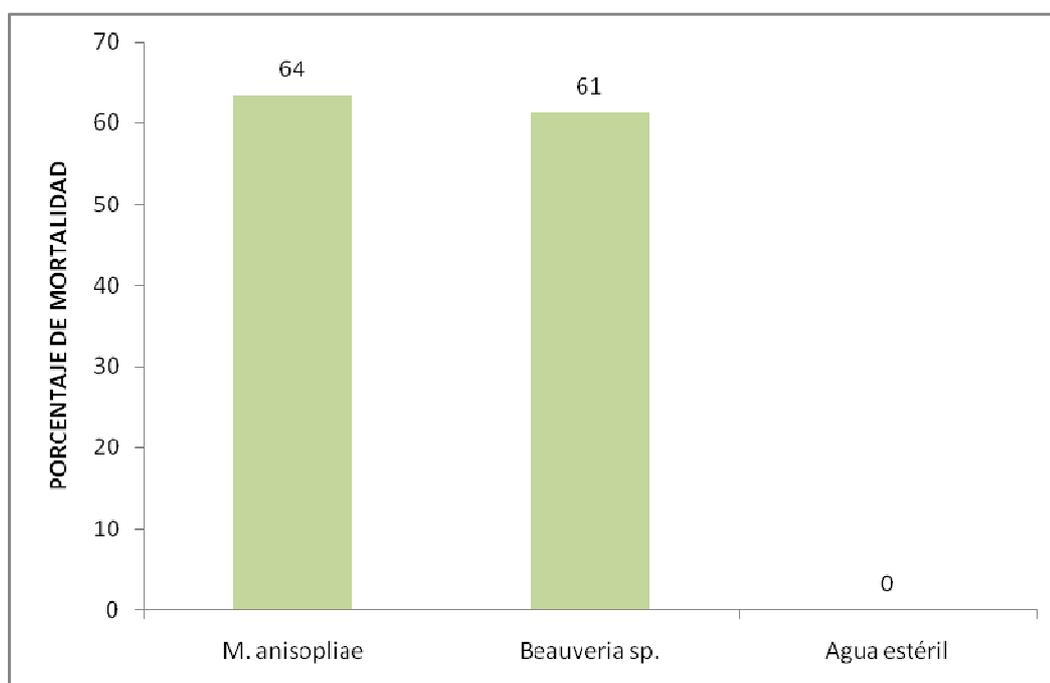


Figura 7. Comportamiento de la mortalidad ejercida por los hongos entomopatógenos.

Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se realizó un ANDEVA (cuadro 11).

CUADRO 11: Resumen del ANDEVA para la variable transformada de mortalidad, laboratorio de CENGICAÑA, 2007.

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F	Pr > F
PLAGA	2	0.05440988	0.02720494	2.42	0.0989 ns
HONGO	2	0.99692840	0.49846420	44.27	0.0001 *
PLAGA*HONGO	4	0.04308642	0.01077160	0.96	0.4388 ns
ERROR	72	0.60806667	0.01126049		
TOTAL	80	1.89593580			

ns = no hay significancia estadística

* = significancia estadística 5%

C.V. = 9.17%

En el resumen del ANDEVA, se determinó que factor Hongo tuvo significancia estadística (menor de 0.05 de probabilidad). Posteriormente, se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (cuadro12).

CUADRO 12: resumen de la prueba de comparación múltiple de medias para el factor hongo.

FACTOR	DESCRIPCIÓN	MEDIA TRANSFORMADA	LITERAL
C1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1.24815	A
C2	<i>Beauveria sp.</i>	1.22000	A
C3	Agua	1.00000	B

Al inocular a los inmaduros con los hongos *M. anisopliae* y *Beauveria sp.* se obtuvieron valores de mortalidad más altos. No existe diferencia significativa entre *M. anisopliae* y *Beauveria sp.*, pudiendo utilizarse cualquiera de los dos hongos para obtener porcentajes de mortalidad de 57% (*Beauveria sp.*) y 62% (*M. anisopliae*).

2.6.2 ESPORULACIÓN:

La esporulación se inició a tomar desde la lectura 6 mortalidad (lectura 1) hasta el día 5 (lectura 5) después de ser introducidas las cámaras húmedas en la incubadora. Para obtener el porcentaje de esporulación, se cuantificó por repetición el número de larvas o ninfas con signos del hongo. Cada larva o ninfa representó el 20% de esporulación (cuadro 13).

CUADRO 13. Resultados de porcentaje de esporulación por cada tratamiento, laboratorio de CENGICAÑA, 2007.

TRAT	DESCRIPCIÓN	R 1	**	R 2	**	R 3	**	PROMEDIO
T1	23°C, Ch - Met.	80	4	80	4	40	2	66
T2	23°C, Ch - Beauv	40	2	40	2	60	3	46
T3	23°C, Ch - agua	0	0	0	0	0	0	0
T4	23°C, Gall - Met	40	2	0	0	60	3	33
T5	23°C, Gall - Beauv	20	1	20	1	0	0	13
T6	23°C, Gall - agua	0	0	0	0	0	0	0
T7	23°C, Gus al - Met.	60	3	40	2	40	2	46
T8	23°C, Gus al Beauv.	20	1	40	2	40	2	33
T9	23°C, Gus al – agua	0	0	0	0	0	0	0
T10	25°C, Ch - Met.	80	4	80	4	60	3	73
T11	25°C, Ch - Beauv.	40	2	60	3	60	3	53
T12	25°C, Ch – agua	0	0	20	1	20	1	13
T13	25°C, Gall - Met.	40	2	40	2	40	2	40
T14	25°C, Gall - Beauv.	60	3	60	3	60	3	60
T15	25°C, Gall – agua	0	0	0	0	0	0	0.0
T16	25°C, Gus al - Met.	40	2	60	3	40	2	46
T17	25°C, Gus al Beauv.	40	2	60	3	40	2	46
T18	25°C, Gus al – agua	0	0	0	0	60	3	20
T19	27°C, Ch - Met.	20	1	20	1	20	1	20
T20	27°C, Ch - Beauv.	20	1	40	2	40	2	33
T21	27°C, Ch – agua	0	0	0	0	0	0	0
T22	27°C, Gall - Met.	40	2	60	3	40	2	46
T23	27°C, Gall - Beauv.	40	2	40	2	40	2	40
T24	27°C, Gall – agua	0	0	0	0	0	0	0
T25	27°C, Gus al - Met.	40	2	40	2	20	1	33
T26	27°C, Gus al - Beauv.	40	2	60	3	60	3	53
T27	27°C, Gus al – agua	0	0	0	0	0	0	0

se realizó transformación de los porcentajes de esporulación (cuadro 22A). La transformación de los datos se hizo con la fórmula $\sqrt{X+1}$. Además se observó el comportamiento de los residuos transformados (figura 9).

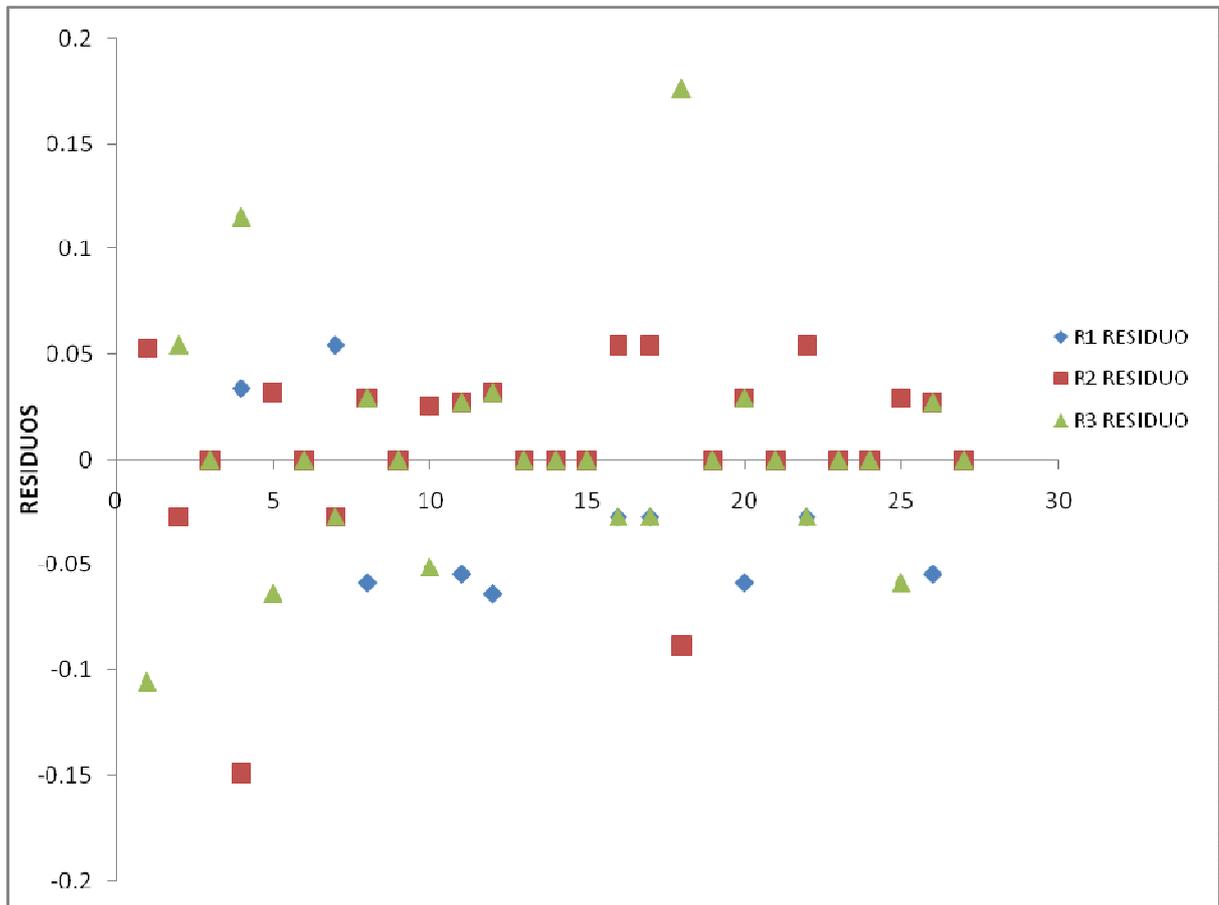


Figura 9. Comportamiento de los residuos transformados para la variable esporulación.

Al realizar la transformación, la prueba de Bartlett mostró los siguientes resultados:

$$H_0 = \sigma^2_1 = \sigma^2_2 = \sigma^2_3 = \dots = \sigma^2_i$$

$$H_a = \sigma^2_i \neq \sigma^2_i, \text{ para algún } i \neq i' \quad \chi^2_o = -123.81, \chi(8,0.05) 38.885.$$

Regla de decisión: H_c menor que H (26, 0.05), se acepta la H_0 lo cual indica que todas las varianzas son homogéneas existiendo homogeneidad de varianzas.

La esporulación estuvo comprendida entre el 0% y el 80%.



Figura 10. Representación del 80% de esporulación de *M. anisopliae* en *Phyllophaga* sp.

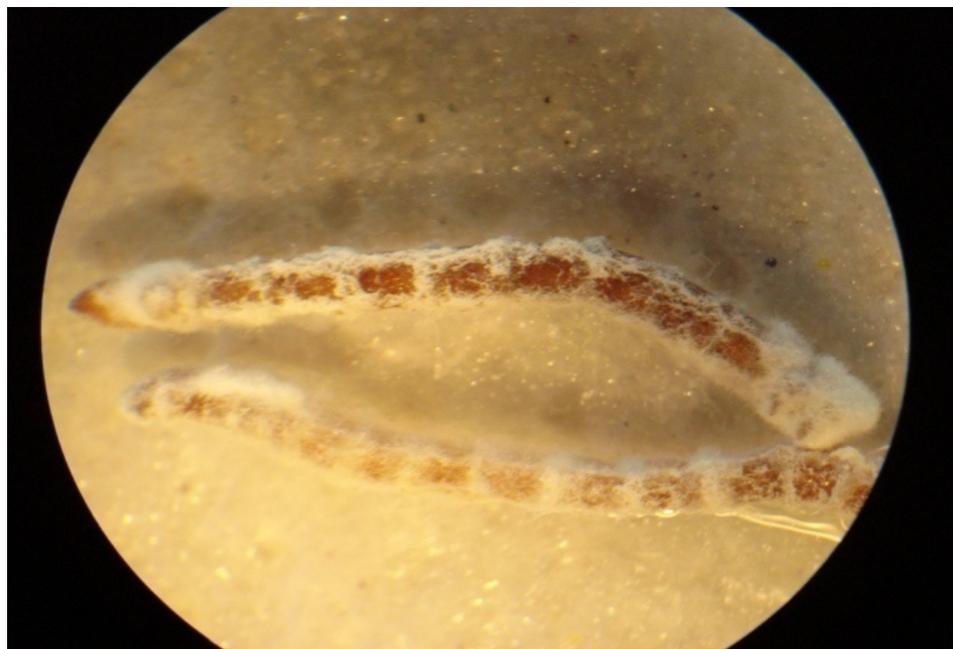


Figura 11. Esporulaci3n en larvas de *Dipropus* sp. inoculadas con *Beauveria* sp.

Para determinar el comportamiento de la esporulación de las larvas y ninfas con respecto a cada temperatura evaluada se realizó el siguiente cuadro.

Cuadro 14. Porcentaje de esporulación promedio para los inmaduros de las plagas evaluadas.

TEMP/INMADURO	<i>Scaptocoris talpa</i>	<i>Phyllophaga</i> sp.	<i>Dipropus</i> sp.	PROMEDIO
23°C	37%	15%	26%	26%
25°C	46%	33%	37%	39%
27°C	18%	29%	29%	25%
PROMEDIO	34%	26%	31%	

Fuente: Ebert, 2007.

La temperatura que presentó el mayor porcentaje de esporulación fue la de 25°C con un 39% de esporulación promedio entre los inmaduros, siguiéndole la temperatura de 23°C con un 26% de esporulación promedio y por último la temperatura de 27°C con 25% de esporulación promedio.

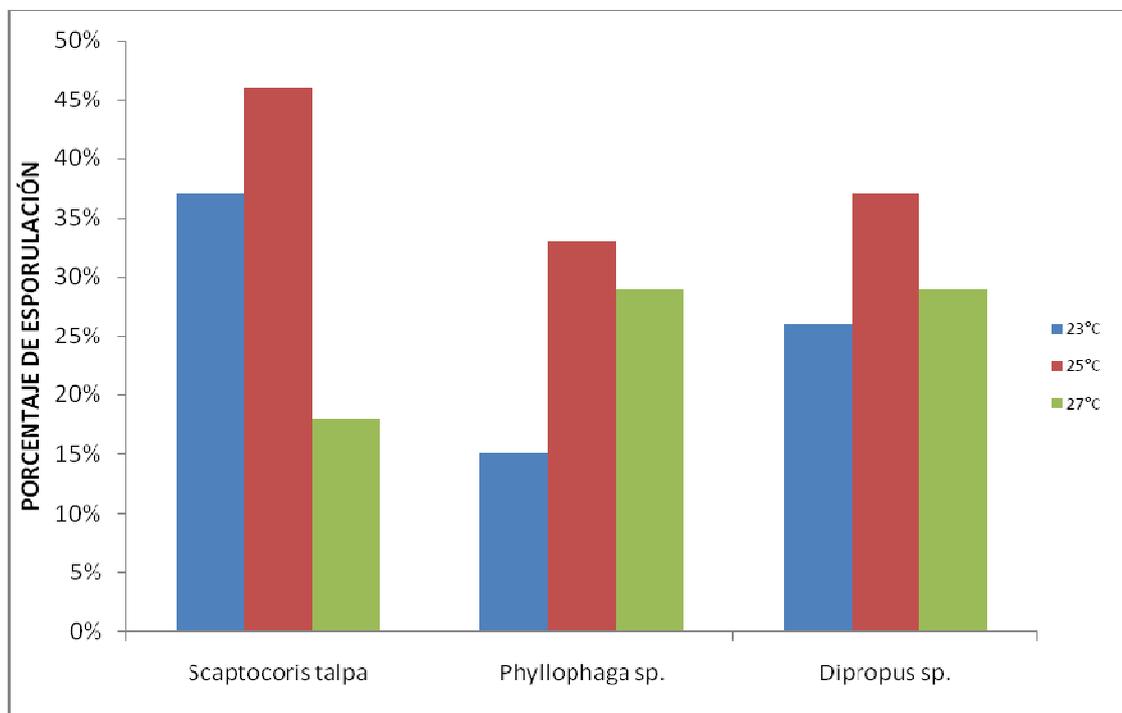


Figura 12. Comportamiento de la esporulación de los inmaduros evaluados.

Para *Scaptocoris talpa*, presentó el 34% de esporulación promedio. En la temperatura de 25°C se tuvo el 46% de esporulación siendo el resultado más alto. A una temperatura de 23°C se tuvo el 37% de esporulación y a 27°C se obtuvo el 18% de esporulación. Donis (13) en el estudio realizado para evaluar el parasitismo del hongo *M. anisopliae* en plagas del suelo, obtuvo resultados del 20% de parasitismo en *Scaptocoris talpa*. En un estudio para evaluar el control de 7 cepas de *M. anisopliae* sobre chinche hedionda, se lograron reducciones de las poblaciones de chinche hedionda del 77% tomando un umbral de 158 insectos/m² (19).

En el caso de *Phyllophaga* sp., se tuvo el 26% de esporulación a 25°C, siguiéndole el 29% de esporulación a 27°C y el 15% de esporulación a 23°C. Díaz (12) presenta niveles de esporulación de 18 a 50% controladas con *Beauveria bassiana*. Ufer et al., (25) determinaron que el parasitismo en larvas de gallina ciega inoculadas con hongos entomopatógenos fue de 0 a 16%. Márquez et al., (20), determinaron el 62% en la reducción de la población de gallina ciega con el umbral de 10 larvas/m².

Dipropus sp, presentó el 31% de esporulación promedio. A 25°C se tuvo el 37% de esporulación, el 29% de esporulación a una temperatura de 27°C y el 26% de esporulación a una temperatura de 23°C. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ufer et al., (25) los cuales obtuvieron parasitismos de 9 a 56% en larvas de gusano alambre inoculadas con hongos entomopatógenos.

CUADRO 15. Porcentaje de esporulación promedio de los inmaduros inoculados con los hongos entomopatógenos.

TEMP//INMADURO	<i>M. anisopliae</i>	<i>Beauveria. sp.</i>	Agua estéril	PROMEDIO
23°C	48%	31%	0%	26
25°C	53%	53%	11%	39
27°C	33%	42%	0%	25
PROMEDIO	45%	42%	4%	

Fuente: Ebert, 2007.

Con el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, se obtuvo el 45% de esporulación promedio. Incubando las larvas inoculadas a 25°C, se tuvo 53% de esporulación, siendo el resultado más alto. A 23°C de temperatura se alcanzó el 48% de esporulación y con la temperatura de 27°C se presentó el 33% de esporulación. Berlanga y Hernández (7) determinaron que a una temperatura de 26°C la esporulación de adultos de *Schistocerca piceifrons piceifrons* ocasionadas por *M. anisopliae* fue de 59%. Cancinos (9), indica que Alves (1986) menciona dentro de los factores climáticos que causan efecto en la infección del hongo *M. anisopliae* se encuentra la temperatura afectando principalmente su estabilidad y eficiencia. El rango de temperatura de 26°C +/- 1°C es el ideal para la infección de este hongo. Alemán (1) indica que Guagliumi *et al.* (1997) trabajaron en la producción comercial del hongo, sembrándolo en arroz e incubándolo a una temperatura de 22 a 36°C. Alemán (1) obtuvo resultados de parasitismo de 50% y 60% de *M. anisopliae* sobre ninfas de *Aenolamia* sp.

Con el hongo *Beauveria* sp. se manifestó el 42% de esporulación promedio sobre los inmaduros evaluados. A una temperatura de 25°C se presentó el 53% de esporulación obteniendo la mayor esporulación. El 42% de esporulación lo alcanzó a una temperatura de 27°C y por último se presentó el 31% de esporulación a una temperatura de 23°C. Badilla y Alves (4) concluyeron que dentro de los factores más importantes en la persistencia de un patógeno en un sustrato, está el efecto de la radiación solar y la temperatura. La aplicación de *B. bassiana* en trampas estuvo favorecida ya que la temperatura del suelo tuvo un rango de 19°C y 27°C.

En el estudio para determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *B. bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons* se obtuvo el 87% de esporulación a una temperatura de 26°C (7). Al evaluar la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria* spp. sobre adultos de *Scaptocoris talpa*, larvas de *Agriotes* sp. y *Phyllophaga* sp., presentaron porcentajes de parasitismo de 28%, 30%, 36% y 54% para diferentes cepas (19).

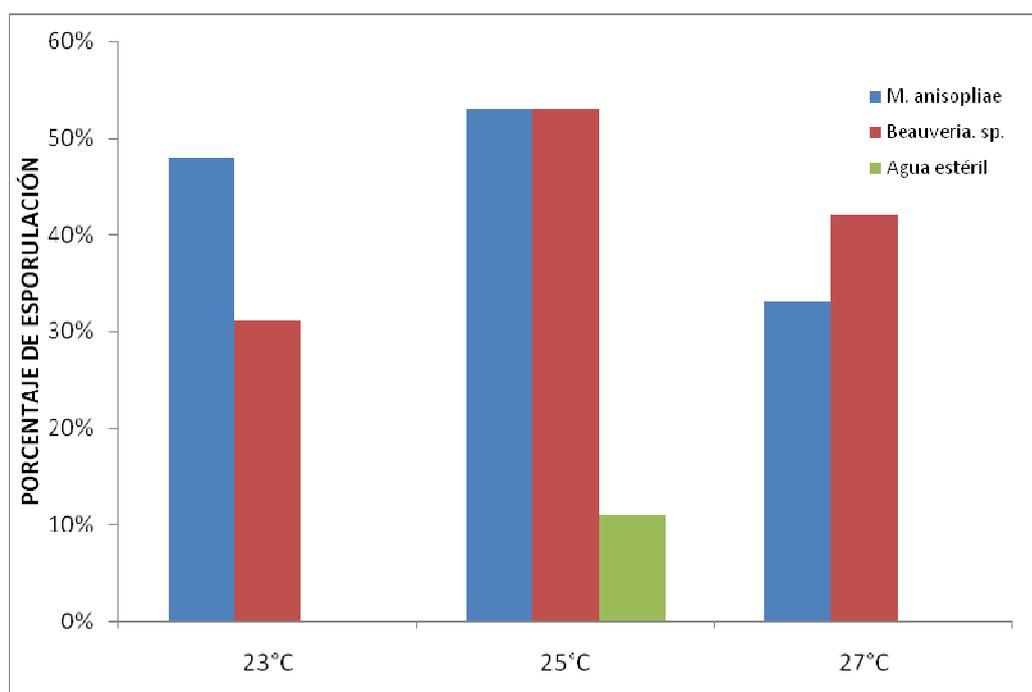


Figura 13. Comportamiento de la esporulación de los inmaduros evaluados.

Se realizó el análisis de varianza para esta variable, para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos (cuadro 17).

CUADRO 16: Resumen del ANDEVA para la variable esporulación.

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	VALOR F	Pr > F
TEMPERATURA	2	0.05731358	0.02865679	9.80	0.0002 *
PLAGA	2	0.01755062	0.00877531	3.00	0.0581 ns
HONGO	2	0.56605432	0.28302716	96.81	0.0001 *
TEMP*PLAGA	4	0.04902716	0.01225679	4.19	0.0050 *
TEMP*HONGO	4	0.02692346	0.00673086	2.30	0.0703 ns
PLAGA*HONGO	4	0.00713086	0.00178272	0.61	0.6573 ns
TEMP*PLAGA*HONGO	8	0.05935802	0.00741975	2.54	0.0201 *
ERROR	54	0.15786667	0.00292346		
TOTAL	80	0.94122469			

ns = no hay significancia estadística * = significancia estadística 5% C.V. = 76%

Tomando en cuenta el modelo estadístico, se obtuvo significancia en el factor temperatura, hongo, interacción temperatura x plaga y la interacción temperatura x plaga x hongo, con lo cual se toma la triple interacción como para el análisis de la prueba múltiple de medias según el criterio de Tukey (cuadro 17).

CUADRO 17: Resumen de la prueba de comparación múltiple de medias para la interacción (TEMP X PLAGA X HONGO) para la variable esporulación.

TRAT	DESCRIPCIÓN	MEDIAS TRANSFORMADAS						
10	25°C, Ch – Met	1.31330	a					
1	23°C, Ch – Met	1.28660	a	b				
14	25°C, Gall – Beauv	1.26000	a	b				
11	25°C, Ch – Beauv	1.23333	a	b	c			
26	27°C, Gus al - Beauv	1.23330	a	b	c			
2	23°C, Ch - Beauv.	1.20660		b	c			
7	23°C, Gus al - Met.	1.20660		b	c			
16	25°C, Gus al – Met	1.20660		b	c			
17	25°C, Gus al – Beauv	1.20660		b	c			
22	27°C, Gall - Met.	1.20660		b	c			
13	25°C, Gall – Met	1.18000		b	c	d		
23	27°C, Gall - Beauv.	1.18000		b	c	d		
8	23°C, Gus al - Beauv.	1.15330			c	d	e	
20	27°C, Ch – Beauv	1.15330			c	d	e	
25	27°C, Gus al – Met	1.15330			c	d	e	
4	23°C, Gall – Met	1.14660			c	d	e	
19	27°C, Ch – Met	1.10000				d	e	
18	25°C, Gus al – agua	1.08660					e	f
5	23°C, Gall – Beauv	1.06660					e	f
12	27°C, Ch – agua	1.06660					e	f
3	23°C, Ch – agua	1.00000						f
6	23°C, Gall – agua	1.00000						f
9	23°C, Gus al – agua	1.00000						f
15	25°C, Gall – agua	1.00000						f
21	27°C, Ch – agua	1.00000						f
24	27°C, Gall – agua	1.00000						f
27	27°C, Gus al – agua	1.00000						f

El tratamiento con la mejor mayor media fue el número 10, correspondiente a la temperatura de 25° C + ninfa de *Scaptocoris talpa* + hongo *Metarhizium anisopliae*.

Los tratamientos 1, 14, 11 Y 26 no tuvieron diferencias significativas entre si.

Los tratamientos que presentaron las medias más bajas fueron: T3, T6, T9, T15, T21, T24, T27.

2.7 Conclusiones y Recomendaciones

2.7.1 Conclusiones

1. Con los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *Beauveria* sp., a 25°C se obtuvieron el 53% y 53% de esporulación respectivamente. Indicando que no existen diferencias estadísticas significativas entre sí.
2. La mortalidad promedio de *Scaptocoris talpa* fue del 41%, superando la mortalidad de *Phyllophaga* sp. con el 30% de mortalidad promedio y el 39% de mortalidad promedio de *Dipropus* sp.
3. Las larvas de *Phyllophaga* sp. presentaron el 26% de esporulación promedio, y a una temperatura de 25°C se obtuvo el 33% de esporulación. Para *Scaptocoris talpa*, se manifestó el 34% de esporulación promedio, y a 25°C se tuvo el 46% de esporulación. En larvas de *Dipropus* sp. se presentó el 31% de esporulación promedio, y a 25°C obtuvo el 37% de esporulación.
4. La temperatura de 25°C presentó 39% de esporulación promedio, superando a la temperatura de 23°C con el 26% de esporulación promedio y a la temperatura de 27°C con el 25% de esporulación promedio.
5. El tratamiento 2, correspondiente a ninfas de *Scaptocoris talpa* inoculadas con *Beauveria* sp. obtuvo el 69% de mortalidad promedio, siendo el mayor resultado obtenido.
6. Para la variable esporulación, se realizó un ANDEVA, obteniendo significancia estadística en la triple interacción. Al realizar la prueba múltiple de medias de Tukey, se determinó que el tratamiento 10 correspondiente a 25°C + ninfas de *Scaptocoris talpa* inoculadas con el hongo *M. anisopliae*. obtuvo la mayor media.

2.7.2 Recomendaciones

1. En base a los resultados obtenidos en esta investigación, se debe realizar ensayos a nivel de campo, evaluando en plagas de la raíz *Scaptocoris talpa*, *Phyllophaga* sp. y *Dipropus* sp. de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), los porcentajes de mortalidad y esporulación de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria* sp., determinando así la diferencia entre los datos derivados de laboratorio y campo.
2. Al realizar experimentos a nivel de laboratorio con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, se recomienda la temperatura de 25°C para obtener el 53% de esporulación.
3. En experimentos desarrollados con hongos entomopatógenos realizados en laboratorio, se hace necesario mantener aséptica el área de trabajo, equipo a utilizar, así como la vestimenta del manipulador del experimento.

2.8 Bibliografía

1. Alemán, M. 1997. Evaluación de nueve cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de chinche salivosa *Aenolamia* sp. bajo condiciones controladas. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 65 p.
2. Azañón Estacuy, VM. 1996. Evaluación de nueve cepas de *Metarhizium* spp. en el control de cuatro plagas insectiles de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a nivel de laboratorio. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad Rafael Landivar, Facultad de Ciencias Agrícolas y Ambientales. 64 p.
3. Badilla, B; Azañón, V; Morales, M de los A. 2001. Evaluación de dosis del hongo *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumoso* Roeus, para el control de chinche hedionda *Scaptocoris talpa* (Hom. Cydnidae) a nivel de laboratorio. In Congreso nacional de la caña de azúcar (10, 2001, GT); Simposio nacional de plagas (2, 2001, GT). 2001. Memorias. Ed. por Adlai Meneses. Guatemala, ATAGUA (Asociación de Técnicos Azucareros de Guatemala). 32-35 p.
4. Badilla, F; Alves, S. 1991. Control de picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vaurie (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* en condiciones de laboratorio y campo. Control Biológico en plagas de caña de azúcar vol. (No. 2): 14 – 32 p.
5. Barrios, C. 2004. Evaluación del parasitismo de *Heterorhabditis* spp. y *Diplogasteritus* spp. sobre *Phyllophaga* spp, *Scaptocoris talpa*, y *Ampedus* spp. a nivel de laboratorio e invernadero, en CENGICAÑA. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 48 p.
6. Berlanga, A; Hernández, V. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *M. anisopliae*, *M. a.* var. *Acridum* y *B. bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons* (en línea). Costa Rica. Consultado 29 set 2008. Disponible en: orton.catie.ac.cr/repdoc/A2101E/A2101E.PD
7. Camó, T. 1999. Evaluación de cuatro aislamientos de *M. anisopliae* para el control microbiano de chinche salivosa (*Aeneolamia* sp.) bajo condiciones controladas. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 68 p.
8. Cancinos, M. 2006. Evaluación de la patogenicidad de once aislamientos de *M. anisopliae* (Metsch) Sor. Sobre gusano alambre *Dipropus* spp. (Coleóptera: Elateridae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 54 p.
9. CAÑAMIP (Manejo Integrado de Plagas en la Caña de Azúcar, GT). 2000. Plagas de la raíz en caña de azúcar. Boletín CAÑAMIP no. 2:sp.
10. _____. 2004. Plagas de la raíz. Boletín CAÑAMIP no. 1:sp.

- 11 Congreso nacional de la caña de azúcar (10, 2001, GT); Simposio nacional de plagas (2, 2001, GT). 2001. Memorias. Ed. por Adlai Meneses. Guatemala, ATAGUA (Asociación de Técnicos Azucareros de Guatemala). 172 p.
- 12 Díaz, P. 2000. Abundancia y distribución de especies de gallina ciega (Coleóptera: Melolonthidae), hongos (Hyphomycetes) y nematodos (Nematoda: Heterorhabditidae) entomopatógenos en los altos de Jalisco, México. Tesis MSc. México, Universidad de Monterrey. Facultad Ciencias Agrícolas, Área de Biotecnología. 125 p.
- 13 Donis, J. 1997. Diagnóstico sobre el parasitismo en plagas del suelo a través de *Metarhizium anisopliae* en caña de azúcar *Saccharum* sp. en Pantaleón, Siquinalá, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 31 p.
- 14 González, E. 2003. Efecto de la temperatura, humedad relativa y humedad del suelo, sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) en larvas de *Anastrepha ludens* (Díptera: Tephritidae). Tesis PhD. México, Universidad de Colima. 165 p.
- 15 López, E. 2004. Exigencias del modelo estadístico. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 15 p.
- 16 Márquez, JM. 2003. Complejo plagas de raíz. *In Memoria*: presentación de resultados de investigación, zafra 2002–2003. Guatemala, CENGICAÑA. 33 p.
- 17 _____. 2005a. 2005. Patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria* spp. sobre adultos de chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*), gusano alambre (*Dipropus* spp.) y gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) bajo condiciones de laboratorio. *In Memoria*: presentación de resultados de investigación, zafra 2004–2005. Guatemala, CENGICAÑA. 49 p.
- 18 _____. 2005b. Efecto de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) y gusano alambre (*Dipropus* spp.) sobre el rendimiento de caña de azúcar. *In Memoria*: presentación de resultados de investigación, zafra 2004–2005. Guatemala, CENGICAÑA. 67 p.
- 19 _____. 2005c. Estimación de pérdidas causadas por el barrenador del tallo (*Diatraea* spp.) en las variedades CP 72-2086 y PR 87-2080. *In Memoria*: presentación de resultados de investigación, zafra 2003–2004. Guatemala, CENGICAÑA. 70 – 112 p.
- 20 Márquez, JM; López, E; Contreras, H; Ralda, G; Maldonado, D. 2005. Evaluación de 7 cepas de *Metarhizium anisopliae* y 2 nemátodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.), campo, finca El Bálsamo (Pantaleón). Guatemala, CENGICAÑA. 173 p.
- 21 Meneses, A; Melgar, M; Posadas, W. 2007. Series históricas de producción, exportación y consumo de azúcar en Guatemala. Guatemala, CENGICAÑA, Boletín Estadístico 8(1):sp.

- 22 Meneses, R; Echeverría, C. 1980. Efectividad de *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* en el control de *Lissorhoptus brevirostris*. Venezuela Universidad Central de Venezuela, Estación experimental del Arroz. 25 p.
- 23 Montepeque, R; Gómez, R; Hernández, A. 1996. Plagas de la caña de azúcar. *In* Simposio nacional de plagas de la caña de azúcar (1, 1996, Guatemala). Resumen de ponencias nacionales. Guatemala, Panamericana. 19 p.
- 24 Ovalle, W; Alemán, M. 1998. Producción y manejo del hongo *M. anisopliae* (Metch) Sor. Guatemala, CENGICAÑA. 18 p.
- 25 Ufer, C; Ovalle, W; Márquez, M. 1999. Evaluación de productos biológicos comerciales para el control de plagas de la raíz. Guatemala, CENGICAÑA. 4 p.
- 26 Zamora, E. 2002. Patogenicidad de *Phacelomyces* sp. en chinche salivosa *Aenolamia póstica* (en línea). Costa Rica, CATIE. Consultado 30 ago 2008. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0748e/A0748e.pdf>

2.9 Apéndice

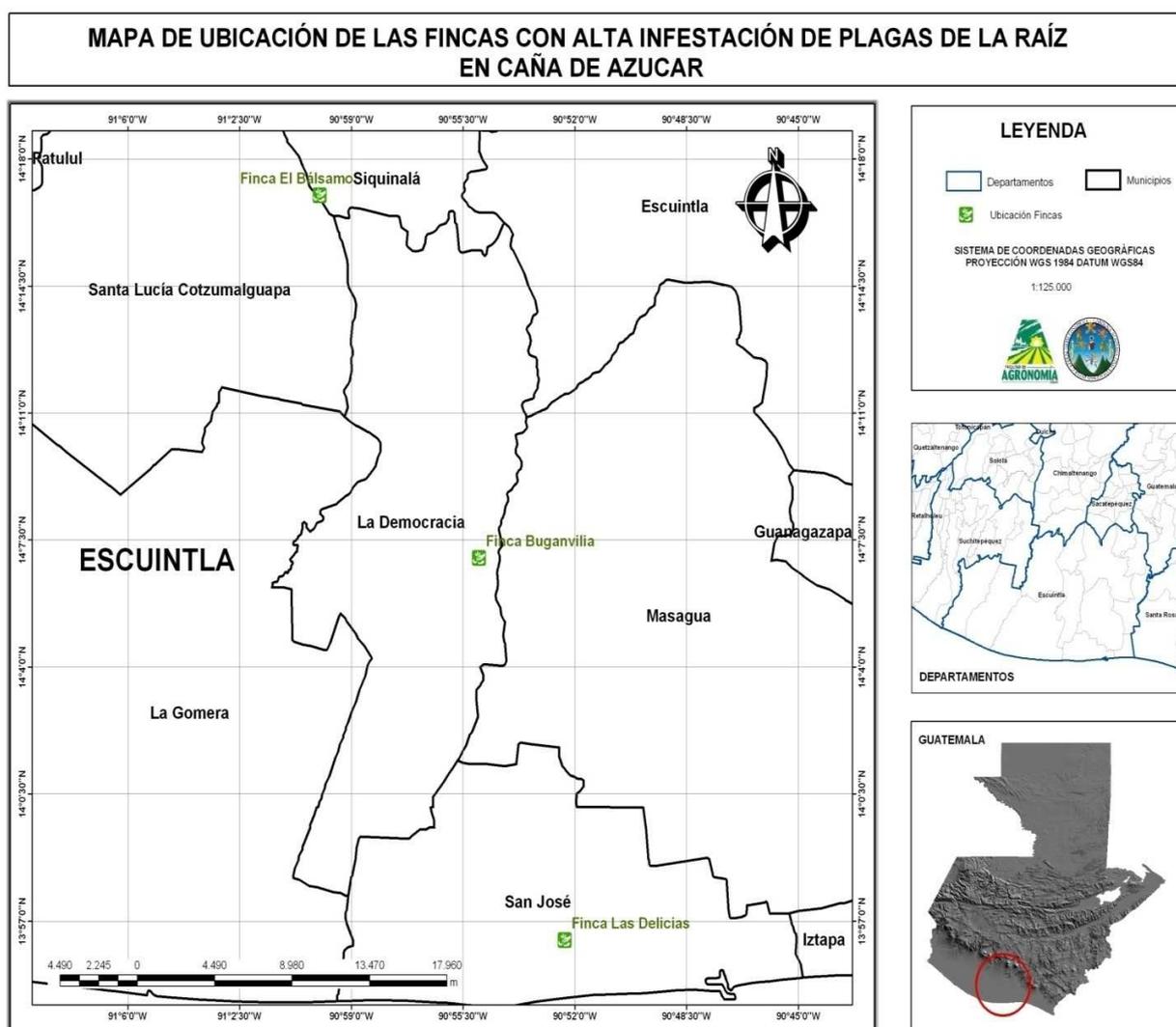


Figura 14A. Mapa de ubicación de las fincas muestreadas. Escala 1: 125,000.

CUADRO 18 A. Coordenadas de las fincas muestreadas.

FINCA	DEPARTAMENTO	LATITUD	LONGITUD
El Bálsamo	Escuintla	14°16'60''N	91°0'0''W
Bugarvilia	Escuintla	14°7'0''N	90°55'0''N
Las Delicias	Escuintla	13°56'28''N	90°52'19''W

FUENTE: traveljournals.net

PROCESO DE LOS INMADUROS CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae*.



Figura 15 A. Introducción de las larvas y ninfas en macetas con plántulas de arroz.



Figura 16 A. Preparación del inóculo, conidias en un volumen de agua estéril.



Figura 17 A. Inoculación de los inmaduros en la suspensión del hongo *Metarhizium anisopliae*.



Figura 18 A. Cámara húmeda en donde se tomaron las lecturas de mortalidad y esporulación.

Cuadro 19A. Prueba de Barlett para la variable mortalidad datos no transformados.

a) Residuos de las repeticiones no transformadas de la variable mortalidad.

TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
T1	-38.33	16.67	-23.33	11.67	36.67	-3.33	-13.33	-23.33	36.67
T2	-35	-20	40	-10	15	40	-10	-20	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	-46.11	-46.11	53.89	28.89	13.89	13.89	33.89	-26.11	-26.11
T5	-42.78	-2.78	-42.78	-17.78	17.22	37.22	17.22	57.22	-22.78
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	-17.78	12.22	-67.78	-7.78	32.22	32.22	-27.78	32.22	12.22
T8	-22.96	-7.96	-14.63	-7.96	-14.63	32.04	-7.96	-7.96	52.04
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b) Residuos de las repeticiones transformadas de la variable mortalidad.

TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
T1	-0.156	0.068	-0.091	0.049	0.140	-0.009	-0.049	-0.091	0.140
T2	-0.260	-0.195	0.036	-0.153	-0.055	0.036	-0.153	0.858	-0.113
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	-0.200	-0.200	0.214	0.123	0.065	0.065	0.142	-0.104	-0.104
T5	-0.187	-0.004	-0.187	-0.069	0.078	0.155	0.078	0.227	-0.091
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	-0.064	0.053	-0.289	-0.024	0.125	0.125	-0.106	0.125	0.053
T8	-0.095	-0.030	-0.058	-0.030	-0.058	0.129	-0.030	-0.030	0.201
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

c) cociente de Barlett no transformado de la variable mortalidad.

SP2	C	Q	Xo2	X2(8,0.05)
642.269513	0.017967	59.8947593	7675.94327	15.507

d) cociente de Barlett transformado de la variable mortalidad.

SP2	C	Q	Xo2	X2(8,0.05)
0.0220463	0.017967	-39.84486	-5106.40427	15.507

Cuadro 20A. Prueba de Barlett para la variable esporulación

a) Residuos de las repeticiones, no transformados de la variable esporulación.

TRAT	R1	R2	R3
T1	13.33	13.33	-26.67
T2	-6.67	-6.67	13.33
T3	0	0	0
T4	6.67	-33.33	26.67
T5	6.67	6.67	-13.33
T6	0	0	0
T7	13.33	-6.67	-6.67
T8	-13.33	6.67	6.67
T9	0	0	0
T10	6.67	6.67	-13.33
T11	-13.33	6.67	6.67
T12	-13.33	6.67	6.67
T13	0	0	0
T14	0	0	0
T15	0	0	0
T16	-6.67	13.33	-6.67
T17	-6.67	13.33	-6.67
T18	-20	-20	40
T19	0	0	0
T20	-13.33	6.67	6.67
T21	0	0	0
T22	-6.67	13.33	-6.67
T23	0	0	0
T24	0	0	0
T25	6.67	6.67	-13.33
T26	-13.33	6.67	6.67
T27	0	0	0

b) Residuos de las repeticiones, transformados de la variable esporulación.

TRATAMIENTO	R1	R2	R3
T1	0.05	0.05	-0.11
T2	-0.03	-0.03	0.05
T3	0	0	0
T4	0.03	-0.15	0.12
T5	0.03	0.03	-0.06
T6	0	0	0
T7	0.05	-0.03	-0.03
T8	-0.06	0.03	0.03
T9	0	0	0
T10	0.03	0.03	-0.05
T11	-0.05	0.03	0.03
T12	-0.06	0.03	0.03
T13	0	0	0
T14	0	0	0
T15	0	0	0
T16	-0.03	0.05	-0.03
T17	-0.03	0.05	-0.03
T18	-0.09	-0.09	0.18
T19	0	0	0
T20	-0.06	0.03	0.03
T21	0	0	0
T22	-0.03	0.05	-0.03
T23	0	0	0
T24	0	0	0
T25	0.03	0.03	-0.06
T26	-0.05	0.03	0.03
T27	0	0	0

Cuadro 22A. Transformación de los porcentajes de esporulación con $\sqrt{x+1}$

TRAT	DESCRIPCIÓN	R1	R2	R3	PROMEDIO
1	23°C, Ch - Met.	1.34	1.34	1.18	1.29
2	23°C, Ch - Beauv	1.18	1.18	1.26	1.21
3	23°C, Ch – agua	1	1	1	1.00
4	23°C, Gall – Met	1.18	1	1.26	1.15
5	23°C, Gall - Beauv	1.10	1.10	1	1.06
6	23°C, Gall - agua	1	1	1	1.00
7	23°C, Gus al - Met.	1.26	1.18	1.18	1.21
8	23°C, Gus al Beauv.	1.10	1.18	1.18	1.15
9	23°C, Gus al – agua	1	1	1	1.00
10	25°C, Ch - Met.	1.34	1.34	1.26	1.32
11	25°C, Ch - Beauv.	1.18	1.26	1.26	1.24
12	25°C, Ch – agua	1	1.10	1.10	1.06
13	25°C, Gall - Met.	1.18	1.18	1.18	1.18
14	25°C, Gall - Beauv.	1.26	1.26	1.26	1.26
15	25°C, Gall – agua	1	1	1	1.00
16	25°C, Gus al - Met.	1.18	1.26	1.18	1.21
17	25°C, Gus al Beauv.	1.18	1.26	1.18	1.21
18	25°C, Gus al – agua	1	1	1.26	1.09
19	27°C, Ch - Met.	1.10	1.10	1.10	1.10
20	27°C, Ch - Beauv.	1.10	1.18	1.18	1.15
21	27°C, Ch – agua	1	1	1	1.00
22	27°C, Gall - Met.	1.18	1.26	1.18	1.21
23	27°C, Gall - Beauv.	1.18	1.18	1.18	1.18
24	27°C, Gall – agua	1	1	1	1.00
25	27°C, Gus al - Met.	1.18	1.18	1.10	1.15
26	27°C, Gus al - Beauv.	1.18	1.26	1.26	1.24
27	27°C, Gus al – agua	1	1	1	1.00

CAPÍTULO III
SERVICIOS REALIZADOS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO
GUATEMALTECO DE INVESTIGACIÓN Y CAPACITACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR.
-CENGICAÑA-

3.1 Presentación

El laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA (Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar) pertenece al Programa de Variedades y su trabajo está enfocado a la propagación *in vitro* de explantes de caña de azúcar y a la caracterización de las variedades a través de marcadores moleculares. Desde el año 1,996, inició operaciones y adoptó protocolos para la propagación *in vitro* de caña de azúcar. En el año 2,000, se realizó el primer estudio con marcadores moleculares y actualmente se siguen realizando este tipo de trabajos.

Dentro de los trabajos que se encuentra realizando el laboratorio de Biotecnología están: analizar la similitud genética de todas las variedades de caña de azúcar de la Colección de Trabajo, continuación al estudio publicado en el 2006, con el objetivo de determinar el gen de resistencia a roya de la F1 en un cruce entre una variedad resistente y una variedad susceptible, caracterización de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, en convenio con CENGICAÑA y CONCYT y transformación de variedades de caña de azúcar genéticamente modificadas.

Debido a la demanda de trabajos planteados por el laboratorio de Biotecnología, se realizó un acuerdo con la FAUSAC (Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala) de contribuir con las actividades a realizar a través de la realización de un E.P.S.A. (Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía) durante el año 2007.

Los servicios realizados en el E.P.S.A. 2007, fueron: extracción de ADN genómico de variedades de caña de azúcar, aplicación de técnicas moleculares en caña de azúcar y hongos entomopatógenos y la implementación del protocolo de geles de poliacrilamida.

3.2 SERVICIO 1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR

3.2.1. Objetivos

1. Extraer ADN genómico de variedades floreadoras de caña de azúcar pertenecientes a la colección de trabajo de CENGICAÑA.
2. Extraer ADN genómico de variedades de caña de azúcar correspondientes a la F1 de un cruce entre una variedad resistente y una susceptible a la roya marrón (*Puccinia melanocephala*).

3.2.2 Metodología

La metodología utilizada para la extracción de ADN genómico de plantas de caña de azúcar fue la de Štorchová *et al.* (2000) citada por Maldonado, A. (1), la cual está siendo implementada actualmente en el laboratorio de Biotecnología de CENGICAÑA. La metodología para la extracción de ADN se describe a continuación:

3.2.2.1 MATERIALES

- Cogollos de la planta de caña de azúcar
- Frascos pequeños (compota)
- Probetas de 100 ml.
- Morteros y pistilos
- Pinzas
- Bisturí
- Agua desmineralizada
- Microtubos con volumen de 1.5 ml.

3.3.2.2 EQUIPO

- Baño María
- Autoclave
- Refrigeradora
- Congelador
- Centrifuga
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Micropipetas
- Vortex

3.2.2.3 REACTIVOS

- Solución de cloroformo y alcohol isopropanol en proporción 24:1
- Mercaptoetanol
- Búfer de extracción (con mercaptoetanol al 0.2%)
- Búfer de lisis
- Búfer TE
- Cloro
- Ácido cítrico
- Nitrógeno líquido
- Alcohol etílico al 70%

3.2.2.4 PROCESO

1. Preparar 30 ml de una solución de cloro con una proporción 5:1 (agua estéril: cloro).
2. Agregarle 30 ml de agua estéril a 3 frascos.
3. Preparar 1 litro de una solución de ácido cítrico en concentración de 1 g./ l.

4. Deshojar la caña, ir cortando nudo por nudo hasta el meristemo (hojas más delgadas y donde se ve un halo rojizo). Rápidamente se corta un trozo de más o menos 4 cm. y se coloca en el frasco con la solución de ácido cítrico.
5. Se extrae el meristemo del ácido cítrico y se pasa por un tren de desinfección, el cual es así: cloro – agua – agua – agua, y se seca con papel suavemente.
6. Se agrega un poco de N₂ líquido (-120° C) al mortero y pistilo. Luego se coloca el meristemo dentro del mortero y se muele con el pistilo tratando de dejar polvillo.
7. El polvillo se coloca dentro de un microtubo identificado de 1.5 μ y se le agregan 500 μl del búfer de extracción y se deja por 20 min. a temperatura ambiente.
8. Después se centrifugan (balancear el peso en la centrífuga) a 11000 rpm / 10 min.
9. Botar el sobrenadante y al microtubo que tiene el sedimento (+/- 200 μl) se le agregan 300 μl de búfer de extracción (el mercaptoetanol se le agrega en el momento de usarlo) y se resuspende el sedimento con la pipeta, luego se le agregan 500 μ del búfer de lisis (o la sumatoria del volumen que ocupa el sedimento + el búfer de extracción).
10. Colocar en el baño maría por 40 min. y revolver los microtubos poco a poco.
11. Se sacan los microtubos y se dejan a temperatura ambiente por 10 min.
12. Agregarle 500 μl (igual cantidad que el búfer de lisis) de cloroformo: alcohol isopropanol y se mueven por 10 min.
13. Centrifugar los microtubos a 11000 rpm / 10 min.

14. Se obtienen 3 fases al centrifugarlos, la primera es el ADN, la segunda son proteínas y la tercera es cloroformo. Con cuidado se extrae con la pipeta la primera fase y se trasvasa a un nuevo microtubo identificado. Se le agrega la misma cantidad de volumen que ocupa el ADN de cloroformo y se revuelve / 10 min., se vuelve a centrifugar a 11000 rpm / 10 min.
15. Nuevamente se trasvasa la fase del ADN a otros microtubos identificados.
16. Agregar 2.5 partes del volumen que ocupa la fase de ADN de alcohol isopropílico.
17. Se revuelve suavemente para que el ADN se forme, al observarse una maraña de ADN, se introducen los microtubos a la refrigeradora por media hora.
18. Luego se centrifugan los microtubos por 10 min. a 11000 rpm.
19. Al centrifugar los microtubos, se observa un pelet blanquecino. El líquido que cubre el pelet se extrae, tratando de no se vaya el pelet en la extracción.
20. Se le agregan 100 µl de alcohol etílico al 70% y se revuelven halando con la pipeta suavemente, tratando de lavar el pelet.
21. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Se le extrae el alcohol con la pipeta y se repite el paso No. 20 y se centrifuga a 14500 rpm por 5 min.
22. Se extrae el alcohol con la pipeta. Los tubos se dejan abiertos tratando de que se evapore el alcohol.
23. Cuando se tenga el pelet sin alcohol pero no completamente seco, se le agregan 40 µl de búfer TE y se les coloca parafilm.
24. Dejar en la refrigeradora por 1 día, al siguiente día se pasan al congelador a -20° C.

25. Luego de terminar la metodología de extracción de ADN, se observa la calidad del ADN a través de un gel de agarosa al 1%, siendo la metodología la siguiente:

3.2.2.5 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN, CARGA Y TINCIÓN DE GELES CON AGAROSA 1%

A) MATERIALES

- Muestras de ADN
- Probeta de 1000 ml
- Beaker 1000 ml
- Earlenmeyer 1000 ml
- Frascos con tapa de rosca
- Microcutos de 1.5 ml
- Tape 3M
- Peine

B) EQUIPO

- Balanza analítica
- Bandeja de electroforesis
- Fuente de poder
- Transiluminador luz ultravioleta
- Cámara de fotos
- Horno de microondas
- Micropipetas
- Puntas

C) REACTIVOS

- Agarosa

- Búfer TAE 1X (Tris-HCl, EDTA, ácido acético).
- Bromuro de etidio
- Búfer de carga (azul de bromofenol, sacarosa)

D) SOLUCIONES:

Estas soluciones se prepararon antes de iniciar el proceso.

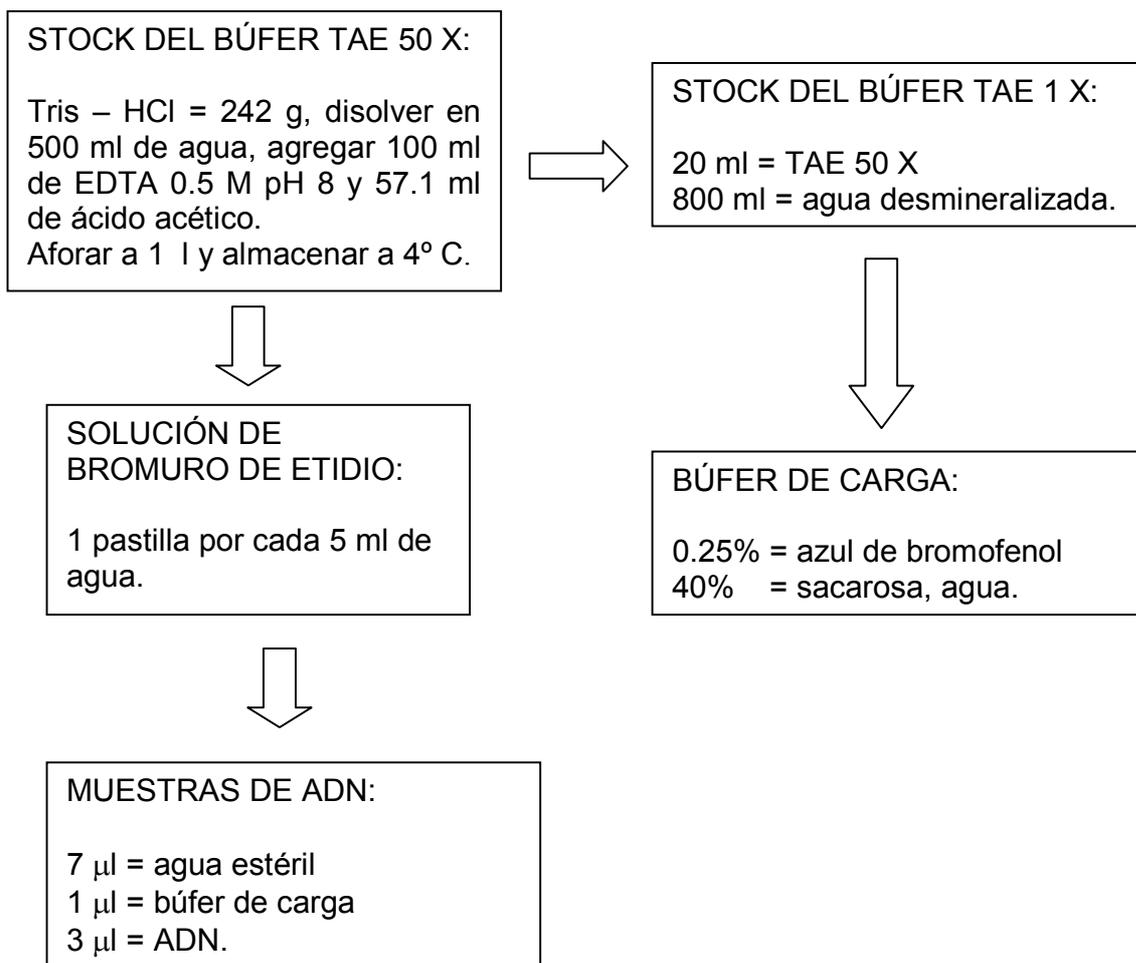


Figura 19. Diagrama de flujo para la elaboración de soluciones en la metodología de geles de agarosa.

E) PROCESO:

- Preparar los moldes de llenado sellando con tape cada lado y llenar el tanque de electroforesis con TAE 1 X.
- Pesar el 1% de agarosa del volumen total a utilizar para llenar el molde deseado.
- Agregar el agarosa a un earlenmeyer que contenga el volumen total de TAE 1X.
- Calentar el earlenmeyer con la mezcla en el horno microondas y revolver hasta que se disuelva la agarosa en el TAE 1 X. (cuando ya no se observe gelatinoso la mezcla).
- Cuando esté disuelta la agarosa, se llena el molde eliminando las burbujas.
- Se colocan los peines con los dientes hacia abajo.
- Se deja solidificar durante 30 min. a temperatura ambiente.
- Remover los peines y el tape y se coloca el molde dentro del tanque de electroforesis.
- Cargar los dientes con las muestras de ADN.
- Conectar el tanque a la fuente de poder con una corriente de 5 V/ cm de distancia entre electrodos. El tiempo de corrida depende del tamaño del molde y de la exigencia del procedimiento.
- Teñir en una bandeja con TAE 1 X el gel agregándole 1 gota de la solución de bromuro de y agitarlo durante 30 – 60 min.
- Observar las bandas de ADN en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.3. Resultados

Se extrajo ADN genómico a 315 variedades floreadoras de caña de azúcar de la colección de trabajo de CENGICAÑA y la extracción de las 130 variedades de la F1 de un cruce entre una variedad resistente y una susceptible a la roya marrón (*Puccinia melanocephala*).

La extracción de ADN se le realizaba en promedio a 30 plantas de caña de azúcar.

3.2.4. Evaluación

Se realizó la extracción de ADN genómico de 315 variedades floreadoras de caña de azúcar pertenecientes a la colección de trabajo de CENGICAÑA.

La extracción de ADN genómico se hizo en 130 variedades de caña de azúcar correspondientes a la F1 de un cruce entre una variedad resistente y una susceptible a la roya marrón (*Puccinia melanocephala*).

3.2.5 Bibliografía

1. Maldonado, A. 2006. Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & P. Syd. (roya marrón de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). In Memoria de presentación de resultados zafra 2005–2006. Guatemala, CENGICAÑA. p. 3-8.

b. SERVICIO 2.APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES EN ADN GENÓMICO DE LAS VARIETADES DE CAÑA DE AZÚCAR, COLECCIÓN DE TRABAJO DE CENGICAÑA.

3.3.1. Objetivo

1. Realizar la reacción y programa PCR de SSR (repetición de secuencia simple microsatélites) en muestras de ADN genómico de caña de azúcar.

3.3.2. Metodología de la técnica de Microsatélites de ADN en caña de azúcar.

3.3.2.1 MATERIALES

- Microtubos de 0.2 ml
- Microtubos de 1.5 ml

3.3.2.2 EQUIPO

- Termociclador
- Centrifuga
- Vortex
- Micropipetas

3.3.2.3 REACTIVOS

- Mezcla de digestión (dNTP, $MgCl_2$, búfer 10X, primer F y Primer R, Taq)

3.3.2.4 MEZCLA DE DIGESTIÓN:

H ₂ O	= 32.8 µl	X	n muestra de ADN	=	x µl
dNTP	= 1 µl	X	"	=	x µl
MgCl ₂	= 2 µl	X	"	=	x µl
Búfer 10 X	= 5 µl	X	"	=	x µl
Primer F	= 2 µl	X	"	=	x µl
Primer R	= 2 µl	X	"	=	x µl
Taq	+ = 0.2 µl	X	"	=	x µl
	45 µl de la mezcla			X µl totales de mezcla.	
	+ 5 µl de ADN				
	50 µl por cada muestra.				

3.3.2.5 PROGRAMA DE PCR:

94° C = 2 min.

94° C = 30 s.

52° C o 54° C* = 1 min.

72° C = 1 min.

72° C = 5 min.

* = sólo para el primer 19 es 52° C.

3.3.2.6 PROCESO:

- Se realizan diluciones 10 X de las muestras de ADN (10 µl de ADN : 90 µl agua estéril).
- Obtener del refrigerador los reactivos de la mezcla y descongelarlos. OJO: la Taq se saca del refrigerador hasta después de agregar el primer R. Luego se pasan por el vortex rápidamente.
- Realizar los cálculos totales para cada uno de los componentes de la mezcla según el número de muestras de ADN.
- Agregar en orden de la mezcla los componentes. OJO: la Taq se coloca en un recipiente que guarde una temperatura de -20° C.

- Al terminar de agregar la Taq, la mezcla se revuelve con una micropipeta, luego pasa por el vortex y por último se centrifuga hasta 14000 rpm durante 1 min. Colocarla en un recipiente que guarde -20° C de temperatura.
- Halar con la micropipeta los 45 μ l correspondientes a cada muestra y descargarlos en microtubos de 0.5 μ l previamente identificados. Luego, se agregan 5 μ l de la dilución de ADN.
- Colocar los microtubos en el termociclador y accionar el programa PCR según el primer a utilizar.

3.3.3. Resultados

Se realizó la optimización de la metodología de microsatélites, obteniendo el programa para la PCR de 30 ciclos y teniendo como dilución de 10X la observación de las bandas de ADN en los geles de agarosa al 3%.

Además se realizaron 315 reacciones de microsatélites de las variedades floreadoras de la colección de trabajo de CENGICAÑA.

3.3.4. Evaluación

Se desarrolló la reacción y programa PCR de SSR (repetición de secuencia simple microsatélites) en 315 muestras de ADN genómico de caña de azúcar.

3.4. SERVICIO 3.PREPARACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

3.4.1. Objetivos

1. Realizar la metodología de los geles de poliacrilamida.
2. Correr en los geles de poliacrilamida el ADN de las reacciones con microsátélites de plantas de caña de azúcar de la colección de trabajo de CENGICAÑA.

3.4.2. Metodología

A través de investigaciones y capacitaciones se logró determinar una metodología a seguir en el laboratorio de Biotecnología. Las investigó en el internet tomando otras metodologías que adoptaron universidades y laboratorios expertos en la materia. Con respecto a las capacitaciones, se realizaron dos, una en el laboratorio de marcadores moleculares del I.C.T.A. (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola) y la segunda en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la U.S.A.C.

Luego de establecida la metodología se procedió a correr el ADN que reaccionó con la técnica de Microsátélites, siendo 315 muestras a las que se le determinaron las bandas del ADN genómico.

3.4.3 Resultados

3.4.3.1 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN Y CARGA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

A) MATERIALES

- Jeringa 60 ml
- Detergente
- Papel toalla

- Guantes
- Recipientes plásticos
- Cristalería necesaria para hacer soluciones.
- Micropipetas y sus respectivas puntas.

B) EQUIPO

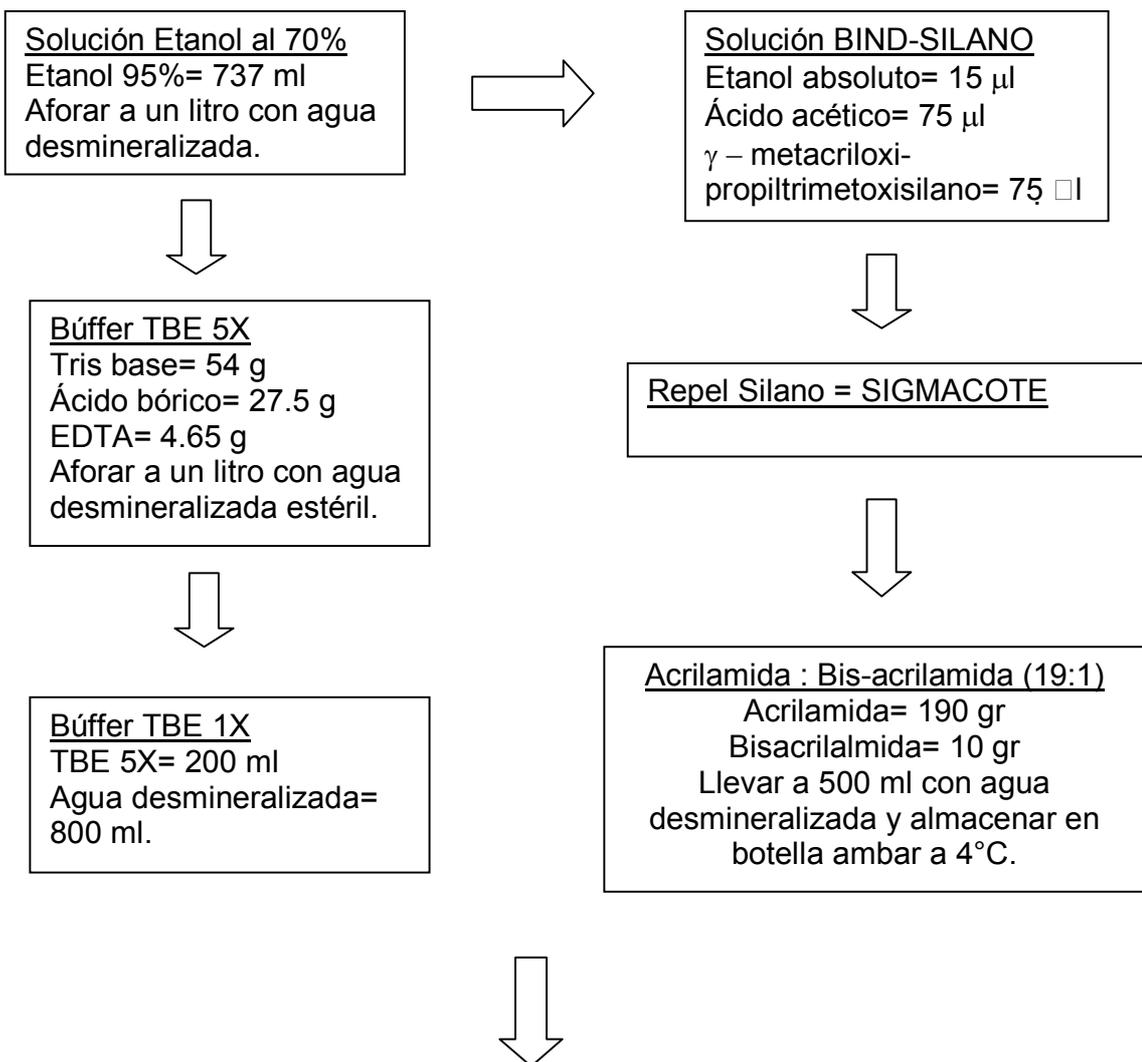
- Sistema de electroforesis de geles de poliacrilamida
- Micropipetas y sus respectivas puntas
- Fuente de poder

C) REACTIVOS

- Etanol 70%
- Etanol absoluto
- Acido acético
- γ metacriloxi-propiltrimetoxisilano
- Sigmacote
- Tris base
- Ácido bórico
- EDTA
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- TBE 5X
- Urea
- TEMED
- Formamida
- Azul de bromofenol
- Xilencianol
- Nitrato de plata

- Formaldehido
- Carbonato de sodio
- Thiosulfato de sodio
- Hidróxido de sodio

D) SOLUCIONES:



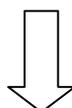
Solución de Poliacrilamida + Urea + TBE 5X

Urea= 400 g

Poliacrilamida= 133.33 ml

TBE 5X= 200 ml

Aforar a un litro con agua desmineralizada estéril y filtrar con papel Whatman No. 1.



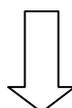
Solución de Poliacrilamida para llenar los vidrios

Solución de poliacrilamida + urea + TBE= 55 ml

Solución de persulfato al 10%= 600 μ l

TEMED= 60 μ l

Agitar con una varilla de vidrio.



STOCK MIX para muestras de ADN 1:

Formamida= 950 μ l

EDTA 0.5 M= 20 μ l

Azul de bromofeno= 1 mg

Xilencianol= 1 mg

Agua estéril= 20 μ l

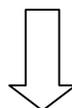
STOCK MIX para muestras de ADN 2:

Formamida= 980 μ l

EDTA 0.5 M= 20 μ l

Azul de bromofeno= 1 mg

Xilencianol= 1 mg



Solución Fijadora

Ácido acético= 100 ml

Aforar a un litro con agua desmineralizada estéril.

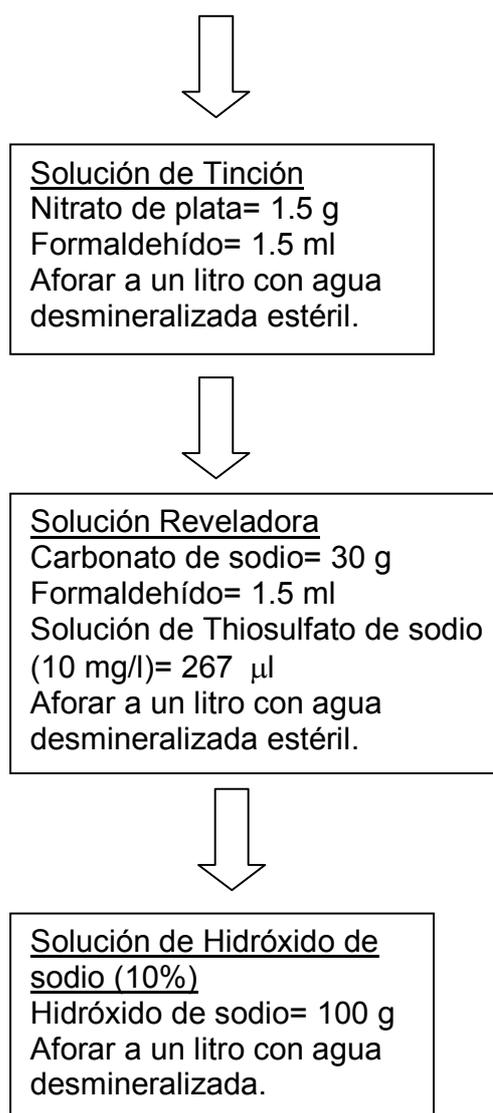


Figura 20. Diagrama de flujo de las soluciones para la metodología de tinción con poliacrilamida.

E) TRATAMIENTO DE LOS VIDRIOS:

- Lavar los vidrios del sistema con detergente común y secarlas con papel toalla SUAVEMENTE para evitar que se rayen y con CUIDADO de no dejar restos de papel.
- Seguir el siguiente procedimiento con cada vidrio por separado:

VIDRIO 1
Rociar con etanol al 70% y secar con papel.
Agregar 30 μ l de la solución de BIND-SILANO y distribuirlo por todo el vidrio con papel.
Rociar con etanol al 70% y secar con papel.
Colocar los separadores en los lados respectivos.

VIDRIO 2
Rociar con etanol al 70% y secar con papel.
Agregar 1500 μ l de la solución de REPEL-SILANO o Sigmacote y distribuirlo por todo el vidrio con papel.
Rociar con etanol al 70% y secar con papel.
Colocar los separadores en los lados respectivos

- Colocar el vidrio 2 sobre el vidrio 1 CUIDANDO QUE NO QUEDEN EN CONTACTO LOS VIDRIOS, y ajustar los lados de los vidrios uniformemente.
- Colocar tape especial y ganchos a presión en el contorno de los vidrios.
- Cargar la jeringa con 55 ml de la solución de poliacrilamida para llenado de los vidrios (CON CUIDADO, LA POLIACRILAMIDA ES NEUROTÓXICA Y EVITAR CONTACTO CON LA PIEL), y depositar entre los vidrios una descarga uniforme. CUBRIENDO TODA EL ÁREA DE LLENADO, EVITANDO LA FORMACIÓN DE BURBÚJAS.
 - Introducir en la parte superior de los vidrios el peine con los dientes hacia arriba. HACIENDO UN TAPÓN PARA EVITAR DERRAMES DEL GEL.
- Esperar 45 min o hasta que polimerice.
- Retirar el peine, el tape y el separador inferior de los vidrios.
- Introducir el peine con los dientes hacia adentro e insertarlo en el gel para que se formen los pozos CON CUIDADO DE NO MOVERLO.

- Posicionar los vidrios dentro del sistema de electroforesis, asegurarlos y terminar de colocar las partes del sistema.
- Llenar con búffer TBE 1X o 0.5X los tanques del sistema.
- Precalentar los vidrios a 65 W y 1800 V y 300 mA por más o menos 30 min, hasta que los vidrios tengan una temperatura de 55°C.
- Limpiar el exceso de urea y poliacrilamida con una pipeta antes de cargar las muestras (cuando llegue a 55°C).

F) PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ADN (simultáneo a la precorrida)

- Colocar en microtubos 20 μ l del STOP MIX y 20 μ l de ADN (reacción de PCR) más o menos dependiendo de la receta de la técnica (el mismo volumen de STOP MIX que el producido por el PCR).
- Desnaturalizar esta mezcla en el termociclador durante 5 min a 95°C y colocar en hielo espúes de transcurrida la desnaturalización.

G) CARGA DE LAS MUESTRAS DE ADN:

- Cargar con 5 μ l de muestra los pozos que dejaron los dientes.
- Poner a correr el sistema a 65 W, 1800 V durante y 300 mA durante 1.5 h. (OBSERVAR A CADA 15 MIN).
- Después de haber corrido el gel se apaga el sistema, se quitan los vidrios y se vacía el búffer de los tanques.
- Con una espátula apartar los vidrios CON CUIDADO DE NO QUEBRARLOS y tomar el vidrio 1 para teñirlo.

H) TEÑIDO DEL GEL:

- Llenar el primer recipiente con la solución fijadora y agitar durante 20 min a 24 h., al finalizar sacar el vidrio y dejarle escurrir la mayor cantidad de ácido acético.
- Trasladar el vidrio al siguiente recipiente plástico con agua desmineralizada para hacerle el primer lavado, agitar durante 10 min. OBSERVAR QUE SE HA ELIMINADO UNA CAPA GRASOSA DEL GEL.

I) TRABAJAR LOS SIGUIENTES PASOS EN OSCURIDAD:

- Introducir el vidrio en otro recipiente plástico con la solución de tinción y agitar durante 20 min.,.
- Realizarle el segundo lavado con agua desmineralizada limpia en el mismo recipiente del primer lavado y agitar por 10 seg.
- Llevar el vidrio a otro recipiente plástico que contenga la solución reveladora (LA SOLUCIÓN REVELADORA SE INTRODUCE A LA REFRIGERADORA UN DÍA ANTES PARA QUE EL REVELADO SEA LENTO) y observar a cada 5 min.
- Al observarse las bandas de ADN, llevar el vidrio al recipiente plástico con la solución fijadora (ácido acético) y mantenerlo así durante 5 min.
- Hacerle el tercer lavado con agua desmineralizada limpia y quitar el exceso de ácido acético.
- Dejar que el gel se seque durante 1 noche a temperatura ambiente o dentro de un horno.

J) DESPRENDIMIENTO DEL GEL:

- Remojar el vidrio 1 en un recipiente que contenga una solución de hidróxido de sodio al 10% durante aproximadamente 4 h. o hasta que se remueva fácilmente el gel.

3.4.4 Evaluación

La metodología para la preparación e implementación de los geles de poliacrilamida fue planteada con la investigación en internet, consultas y observación de las metodologías planteadas por el laboratorio de marcadores moleculares del ICTA y el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la USAC.

Se implementó la metodología planteada para la preparación e implementación de geles de poliacrilamida y se hicieron las pruebas con 315 plantas de caña de azúcar de la colección de trabajo de CENGICAÑA.

3.5. OTROS SERVICIOS

Además de los servicios principales realizados en el área de Biotecnología, se desarrollaron los siguientes servicios en el Programa de Manejo Integrado de Plagas y el laboratorio de Entomología de CENGICAÑA.

3.5.1 ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA

1. Extracción de ADN del hongo *Metarhizium* sp.
2. Caracterización de cepas de *Metarhizium* sp. a través de la técnica de RAPD`s.
3. Cultivos monospóricos de cepas del hongo *Metarhizium* sp.
4. Reordenamiento de los reactivos del laboratorio.
5. Compilación de las metodologías para el proyecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. (medio semiselectivo para *Metarhizium* sp en suelo, medio líquido para crecimiento de micelio de *Metarhizium* sp. y de los anteriormente enumerados).

3.5.2 PROGRAMA DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS

1. Reordenamiento de las cepas de la colección de hongos entomopatógenos de CENGICAÑA.
2. Colección 2007 de cepas de hongos entomopatógenos de CENGICAÑA.
3. Bioensayo: evaluación de hospederos en estado inmaduro para la revigorización de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.
4. Bioensayo: evaluación de la viabilidad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beuaveria* sp. en 2 métodos de conservación de cepas: Aceite mineral y desecación en sílica gel.
5. Producción comercial del hongo *Metarhizium*.
6. Compilación de las metodologías empleadas en el EPS 2007 (medio de cultivo con haba y jugo de vegetales, siembra del hongos entomopatógenos, proceso de conservación del hongo *Metarhizium* y *Beuaveria*.)