



**Departamento de Investigación y Extensión  
de la Caña de Azúcar**

**- DIECA -**

**INFORME DE CONTROL DE CALIDAD**



**DE LAS UNIDADES DE BIOTECNOLOGÍA Y PRODUCTOS  
BIOLÓGICOS CORRESPONDIENTE AL AÑO 2019**

**Abril 2020  
Grecia, Costa Rica**

## Presentación

La gestión tecnológica desarrollada por el **Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA)**, presenta enfoques diferenciados en consideración de que aborda y desarrolla temas técnicos desde una perspectiva de investigación y validación; como también adicionalmente, la vinculada con la asistencia técnica especializada y la capacitación del sector productor. En esta misión de servicio también se tiene un desempeño relevante en lo concerniente a la venta y comercialización, por medio del cual se venden productos biológicos (parasitoides, hongos entomopatógenos, plantas *in vitro*, semilla, etc.) a usuarios nacionales e internacionales interesados en su adquisición. En este particular el control de calidad de los mismos resulta esencial. La calidad puede definirse como un conjunto de características de un producto o servicio, que le confieren la capacidad de satisfacer una necesidad. Esto significa que la calidad de un producto o servicio, es equivalente al nivel de satisfacción que le ofrece a su consumidor y está determinado por las características específicas del producto o servicio. La implementación del control de calidad ha permitido a la empresa ofrecer productos de mayor y mejor calidad, lo cual tiene una influencia positiva en la satisfacción de los usuarios.

El uso de productos biológicos ha aumentado en todo el mundo y muchas compañías se están orientando y abocando actualmente a la producción en masa de estos organismos; motivo por el cual, la implementación de medidas de control de calidad en la producción resulta indispensable para evitar la pérdida de las características del producto y mantener un estándar de calidad en la producción final. El control de calidad de controladores biológicos debe involucrar todos los aspectos que puedan influir en su desempeño final. Estos aspectos deben tener revisiones periódicas y recomendaciones para mejorar el sistema de producción.

En el caso de LAICA, a través de su trayectoria en la producción de controladores biológicos desde el año 1984, se ha enfocado en la implementación de una metodología de control de calidad que involucra aspectos claves, como: el personal de las áreas de producción, actualización e implementación de nuevas metodologías, inspecciones, medidas estrictas de asepsia, entre otras. La aplicación de esta metodología ha permitido ofrecer productos de calidad garantizada, los cuales satisfacen las necesidades de los usuarios azucareros nacionales e internacionales, obteniendo así su confianza para la aplicación de productos producidos por LAICA.

Como parte de la metodología de control de calidad, en el presente informe se exponen los principales resultados obtenidos durante el **año 2019** en los diferentes procesos de producción desarrollados en los laboratorios; los cuales han sido posibles gracias al empeño, capacidad y profesionalismo de todo el personal de laboratorio involucrado en esta labor.

**Ing. Agr. Marco A. Chaves Solera, MSc**  
**Gerente DIECA**

## Personal técnico de DIECA

Las labores de Control de Calidad fueron ejecutadas de manera coordinadas por los siguientes funcionarios responsables:

Ing. Agr. Ana Isabel Alpizar Alfaro.	Coordinadora del Programa de Control de Calidad.
Ing. Agr. Erick Chavarría Soto.	Programa de Fitosanidad (Laboratorio Cultivo de Tejidos).
Ing. Agr. Alejandro Rodríguez Morales.	Programa Control Biológico (Laboratorio de Parasitoides y Hongos Entomopatógenos).

El sincero agradecimiento institucional a todos los funcionarios y colaboradores involucrados que con su participación de una u otra manera brindan apoyo logístico y técnico al programa, para la correcta y justa ejecución de los protocolos y evaluaciones realizadas en las diferentes unidades (laboratorios) y procesos involucrados.



# Índice

	Pag
<b>Presentación .....</b>	ii
<b>Introducción .....</b>	iii
<b>1. Control de calidad laboratorio de <i>Cotesia flavipes</i> .....</b>	5
1.1 Determinación de la sanidad de adultos de <i>Diatraea saccharalis</i> (hospedero).....	5
1.2 Evaluación de la eficiencia de los diferentes procesos de producción para la obtención del parasitoide de <i>Cotesia flavipes</i> .....	7
1.3 Relación de los puparios de <i>Cotesia flavipes</i> con respecto a la cantidad y sexo de las avispas obtenidas. ....	13
<b>2. Control de calidad en el proceso de producción de Hongo Entomopatógenos.....</b>	19
2.1. Revisión de matrices líquidas para la inoculación de bolsas de arroz.....	19
2.2 Determinación de la concentración de conidios, pureza microbiológica y viabilidad de los hongos <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i> .....	22
2.3 Medición de las pérdidas en el proceso de producción e inoculación de bolsas con sustrato (arroz) .....	28
<b>3. Control de calidad Laboratorio Cultivo de Tejidos .....</b>	30
3.1 Pruebas de ELISA realizadas a las variedades de caña de azúcar a reproducir en Laboratorio de Cultivo de Tejidos .....	30
3.2 Cuantificación de las pérdidas de plántulas de Cultivo in Vitro en los invernaderos	33
3.3 Cuantificación e identificación de pérdidas de frascos en la reproducción de Plántulas <i>in vitro</i> .....	36
	38
<b>4. Asepsia en los laboratorios.....</b>	
4.1 Plaqueo para determinar nivel de contaminación aérea en las diferentes áreas de los laboratorios de <i>Cotesia flavipes</i> , Hongos Entomopatógenos y Cultivo de Tejidos .....	38
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	
5.1 Laboratorio <i>Cotesia flavipes</i> .....	43
5.2 Laboratorio Hongos Entomopatógenos.....	44
5.3 Laboratorio Cultivo de Tejidos .....	44
5.4 Asepsia de Laboratorios.....	45

## 1. Control de Calidad Laboratorio de *Cotesia flavipes*

### 1.1. Determinación de la Sanidad de adultos de *Diatraea saccharalis* (hospedero)

#### **Justificación:**

Las larvas de *Diatraea saccharalis* son infectadas por pequeños microorganismos llamados microsporidios, el más frecuente es el protozooario perteneciente al género *Nosema*, agente causal de la enfermedad denominada larva blanca. La presencia de esta enfermedad provoca la destrucción del tejido graso en las larvas, induciendo con ello en una reducción de la producción hormonal juvenil y generando larvas con un desarrollo anormal.

**Objetivo:** Garantizar que las posturas (huevos) obtenidas de adultos de *Diatraea saccharalis* se encuentran libres de microsporidios, para que puedan ser utilizados como pie de cría.

#### **Procedimiento:**

Se realiza una selección de 20 adultos, divididos en 10 machos y 10 hembras, formando 10 parejas por lote en periodos de producción estables (sin exportaciones), cuando aumenta la producción el análisis se le realiza a 5 parejas de dos lotes distintos, de igual manera con un total de 10 parejas. Cada pareja es colocada en una cámara para la obtención de los huevos, posteriormente las parejas de adultos son colocadas en viales y se llevan al laboratorio de biología molecular, donde la especialista a cargo realiza el diagnóstico molecular de la infección. En caso de que el diagnóstico resulte positivo, las posturas obtenidas de esa pareja se descartan. Por lo tanto los huevos obtenidos de los adultos que no presentan microsporidios son usados para el pie de cría de larvas de *Diatraea* sp.

## Resultados.

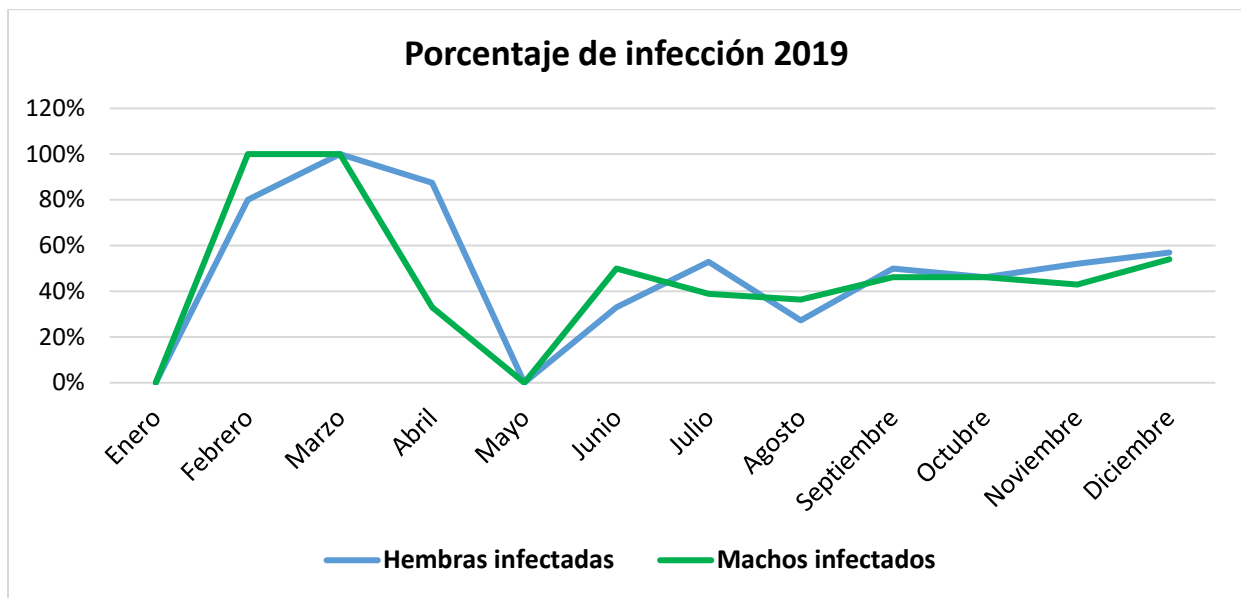
En el Cuadro 1 y Figura 2 se presenta mensualmente la proporción de machos y hembras infectadas con microsporidios durante el año 2019, donde se observa que los machos presentaron mayor porcentaje de infección en los meses de febrero y marzo, mientras que las hembras presentaron mayor infección en el mes de marzo.

En el promedio anual se obtuvo un 49% de infección por microsporidios en hembras y 46% en los machos, para un porcentaje de infección total de individuos de un 48%, valor superior al 2018, donde se reportaron del total de adultos de *Diatraea saccharalis* analizados un 48% para las hembras y un 38% para los machos. Se mantiene la tendencia de mayor infección en hembras que en machos.

El aumento en la infección de adultos de *Diatraea*, es consecuencia de la pérdida de vigorosidad del pie de cría, a pesar de que no se han presentado repercusiones en la producción del hospedero, podría afectar a futuro en la cantidad de adultos producidos y en la calidad de las larvas.

**Cuadro 1.**  
**Porcentaje de adultos de *Diatraea saccharalis* infectados con microsporidios.**

Mes	Promedio de Hembras con microsporidios	Promedio de Machos con microsporidios	Promedio total de individuos infectados
Enero	0%	0%	0%
Febrero	80%	100%	90%
Marzo	100%	100%	100%
Abril	88%	33%	72%
Mayo	0%	0%	0%
Junio	33%	50%	41%
Julio	53%	39%	46%
Agosto	27%	36%	32%
Septiembre	50%	46%	48%
Octubre	46%	46%	46%
Noviembre	52%	43%	47%
Diciembre	57%	54%	55%
<b>Promedio 2019</b>	<b>49%</b>	<b>46%</b>	<b>48%</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,31</b>	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>
<b>Promedio 2018</b>	<b>48%</b>	<b>38%</b>	<b>44%</b>



**Figura 2.** Comparación de los porcentajes de infección con microsporidios de hembras y machos analizados en el 2019.

## 1.2 Evaluación de la eficiencia de los diferentes procesos de producción para la obtención del parasitoide de *Cotesia flavipes*.

### Justificación.

En el proceso de producción de larvas de *Diatraea* para obtener el parasitoide *Cotesia flavipes* se requiere que las mismas logren un buen desarrollo y finalmente una mayor producción de crisálidas.

La producción del hospedero forma parte de un ciclo de vida, fraccionado en etapas que deben cumplirse en el proceso del laboratorio, por lo que la primera etapa comprende la emergencia de los adultos, los cuales una vez que ovopositen, producirán los huevos o posturas que se necesiten para la producción de larvas, unas destinadas para la obtención de pies de cría y otras para ser parasitadas para obtener el parasitoide.

### Objetivo.

Cuantificar las pérdidas de los individuos producidos en las diferentes etapas del proceso que se llevan a cabo para completar el ciclo del hospedero y el parasitoide, con el fin de determinar y analizar los factores que inciden directamente sobre dichas pérdidas.

## **Procedimiento.**

Se realizó la recolección de los datos de producción generados en las distintas salas del laboratorio de *Cotesia flavipes*. Dichos datos se tabulan y son analizados de acuerdo a las etapas de producción, considerando las pérdidas de larvas, crisálidas y la eficiencia en la obtención de puparios.

## **Resultados.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas críticas del proceso de producción, desde la etapa inicial, hasta la obtención de los parasitoides que son entregados a los clientes.

### **1) Determinación de las pérdidas de larvas para la producción de crisálidas.**

El acondicionamiento de las larvas de *Diatraea saccharalis*, consiste, en dotar a las larvas de los requerimientos nutricionales y ambientales óptimos y necesarios para alcanzar un desarrollo adecuado. Una mayor vigorosidad de las larvas permitirá a estas pasar en mayor número a la formación de crisálidas, esta etapa es de suma importancia ya que de aquí se obtiene el pie de cría de *Diatraea saccharalis*.

El acondicionamiento de las larvas requiere necesariamente del manipuleo del personal del laboratorio, por lo que sumado a condiciones de ambiente, contaminación y aspectos fisiológicos conllevan a provocar pérdidas de individuos por muerte o bajo desarrollo.

En el Cuadro 2 y la Figura 3 se presentan las pérdidas mensuales de larvas, obtenidas en el 2019, donde se observa que de un total de 60.196 larvas acondicionadas, se perdieron en promedio 4.840 larvas, correspondiente a un 5%. Del año 2018 al 2019 disminuyó en un 3% el porcentaje de pérdida. La tendencia mensual en general fue variable, la mayor pérdida de individuos se obtuvo en el mes de octubre con un 10%, mientras que en el mes de febrero no se presentaron pérdidas. La muerte de larvas por razones desconocidas antes de alcanzar su estado de crisálida, presencia de alguna deformidad o el no alcanzar la etapa de crisálidas, son las principales razones por las cuales se descartan los individuos.

**Cuadro 2.**

**Cantidad de larvas acondicionadas y pérdidas mensuales en el proceso durante el año 2019.**

Mes	Crisálidas	Pérdida de Crisálidas para obtención de Adultos de <i>Diatraea saccharalis</i> (%)	Adultos de <i>Diatraea saccharalis</i>
Enero	5.059	2%	4.936
Febrero	4.602	0%	4.586
Marzo	5.427	2%	5.305
Abril	4.741	2%	4.646
Mayo	4.737	3%	4.590
Junio	8.967	2%	8.816
Julio	6.717	4%	6.471
Agosto	3.773	5%	3.578
Septiembre	3.433	2%	3.357
Octubre	3.623	10%	3.250
Noviembre	4.131	6%	3.867
Diciembre	4.986	6%	4.683
<b>Total</b>	<b>60.196,00</b>	<b>46%</b>	<b>58.085</b>
<b>Promedio 2019</b>	<b>5.016,33</b>	<b>5%</b>	<b>4.840</b>
<b>Desv. Estándar</b>	<b>1.465,58</b>	<b>3%</b>	<b>1.476</b>
<b>Coef. Variación</b>	<b>29%</b>	<b>60%</b>	<b>30%</b>
<b>Promedio 2018</b>	<b>5 171</b>	<b>8%</b>	<b>4 757</b>



**Figura 3.** Comportamiento del porcentaje de pérdida que se obtuvo durante el 2019, en la producción de crisálidas.

## 2) Evaluación de la eficiencia en la parasitación de larvas de *D. saccharalis* para la obtención de pupas de *Cotesia flavipes*.

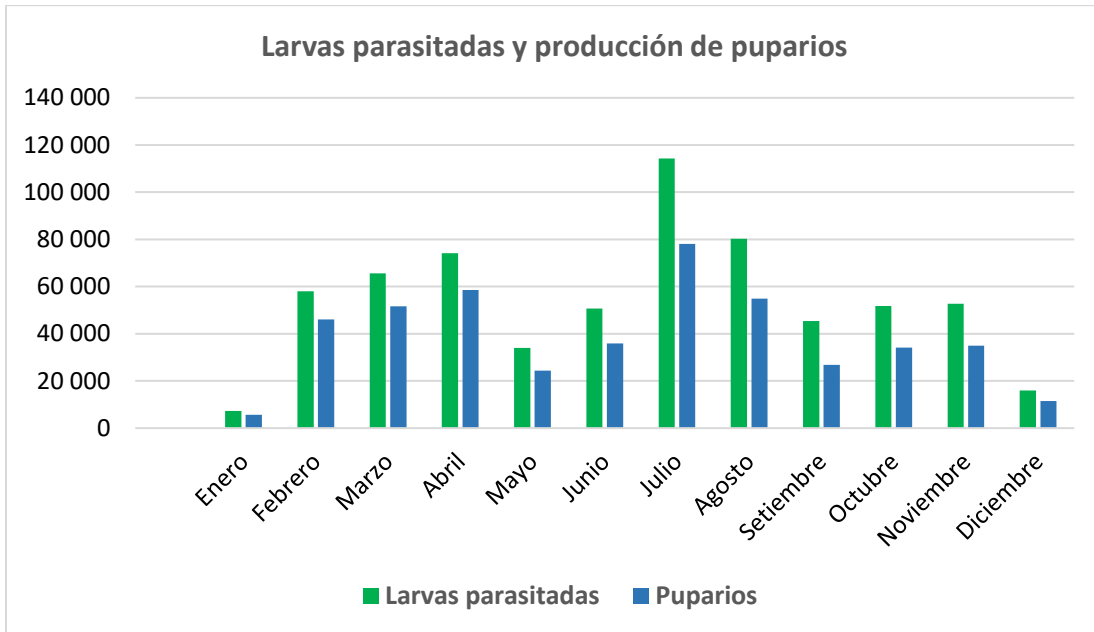
La parasitación se realiza cuando las larvas de *Diatraea* alcanzan un buen desarrollo, esto es a los 14 días de edad. Si las larvas no cumplen con este periodo de tiempo, la eficiencia esperada en la parasitación se verá comprometida provocando una importante disminución de los puparios de *Cotesia flavipes* obtenidos.

En el Cuadro 3 se presenta la cantidad de larvas parasitadas, el porcentaje de eficiencia y la cantidad de puparios de *Cotesia* obtenidos. Como se observa en dicho cuadro, la eficiencia promedio en este proceso fue de 71,46% con un promedio de 54,206 larvas parasitadas, el valor máximo fue de un 79,3% de eficiencia en el mes de febrero.

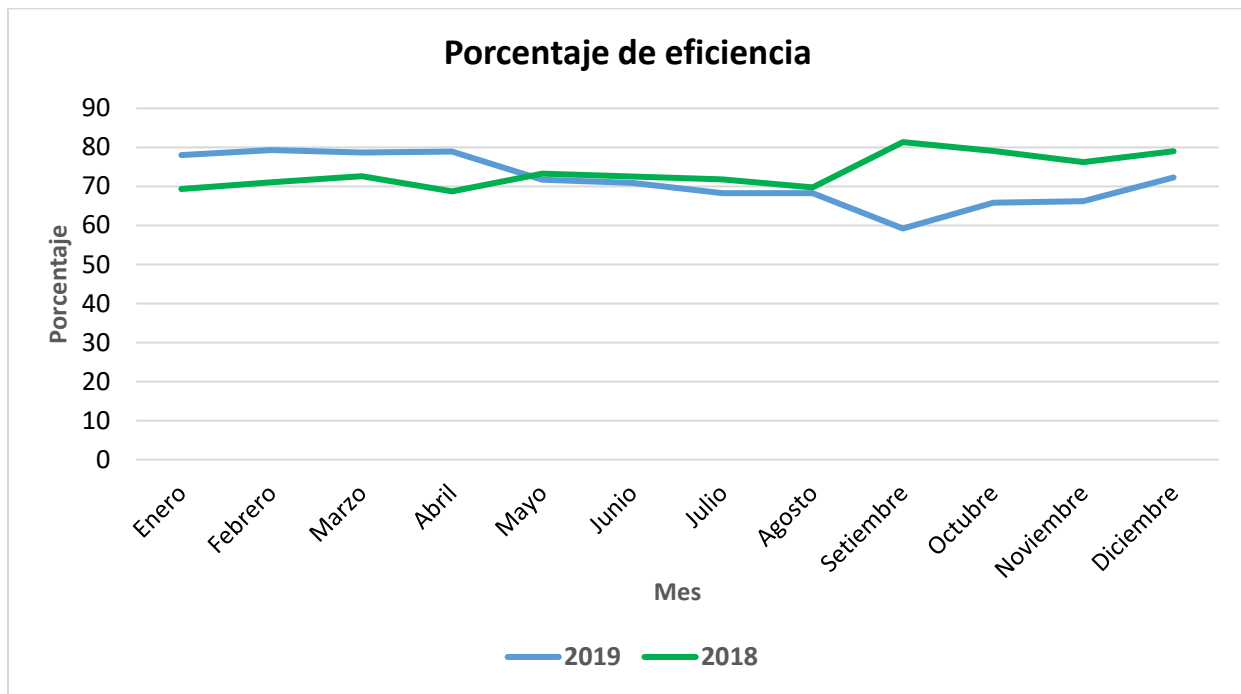
En este periodo de evaluación la eficiencia en la parasitación aumento en promedio un 7,11%, respecto al año 2018, pasando de un 64% a un 71%. En la Figura 8 se observa el comportamiento de las eficiencias a través de los años 2018 y 2019.

**Cuadro 3.**  
**Porcentaje de eficiencia mensual entre las larvas parasitadas y puparios de *C. flavipes* obtenidos en el año 2019.**

Mes	Larvas parasitadas	Puparios	% Eficiencia	
			2019	2018
Enero	7.293	5.688	78,0	69,4
Febrero	58.063	46.055	79,3	71,0
Marzo	65.665	51.694	78,7	72,6
Abril	74.154	58.528	78,9	68,7
Mayo	34.058	24.424	71,7	73,2
Junio	50.715	35.953	70,9	72,5
Julio	114.356	78.045	68,2	71,8
Agosto	80.318	54.851	68,3	69,7
Setiembre	45.366	26.838	59,2	81,3
Octubre	51.798	34.085	65,8	79,0
Noviembre	52.783	34.936	66,2	76,2
Diciembre	15.903	11.491	72,3	79,0
<b>Total</b>	<b>650.472</b>	<b>462.588</b>	<b>71,12</b>	<b>72,6</b>
<b>Promedio</b>	<b>54.206</b>	<b>38.549</b>	<b>71,46</b>	<b>64,35</b>
<b>Desv. Estándar</b>	<b>27, 410</b>	<b>19, 668</b>	<b>6,35</b>	<b>6,06</b>
<b>Coef.Variación</b>	<b>51%</b>	<b>51%</b>	<b>9%</b>	<b>9%</b>



**Figura 7.** Cantidad de larvas parasitadas correspondientes a cada mes del año 2019.



**Figura 8.** Comportamiento de la eficiencia de parasitación durante el año 2019 vs 2018.

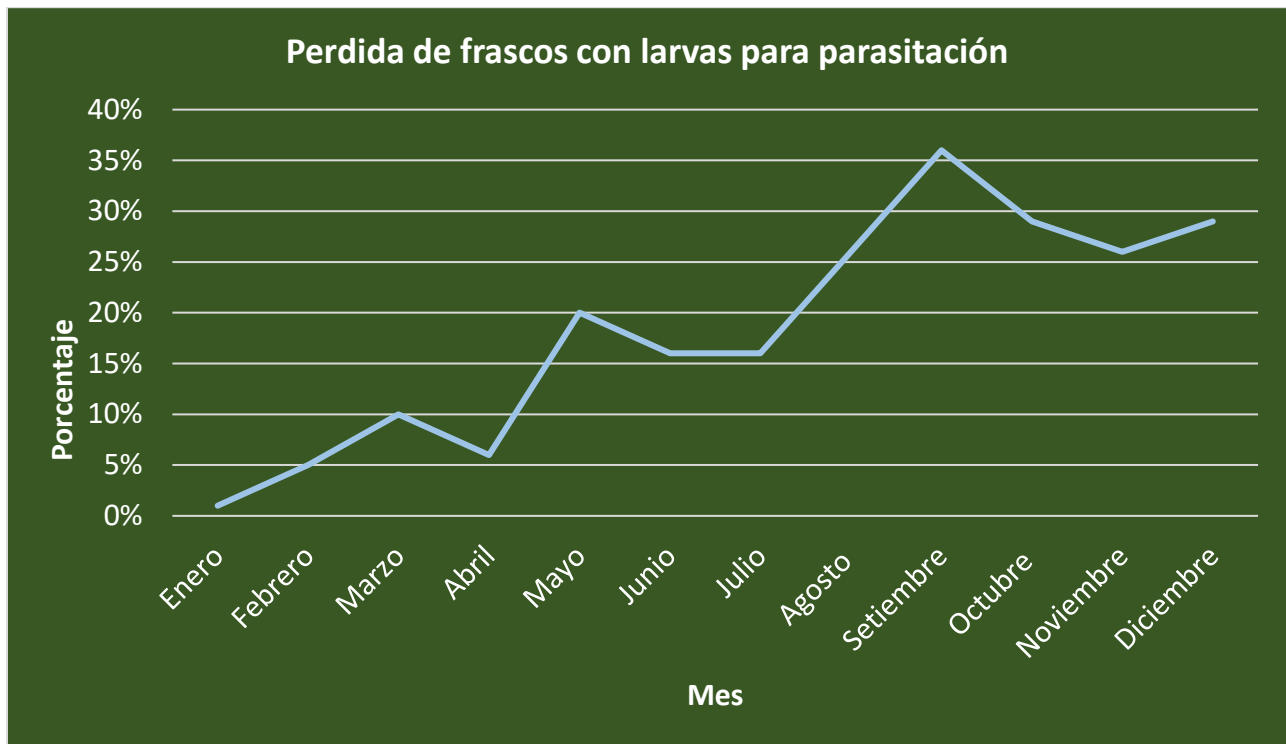
### 3) Control de Frascos con dieta, utilizados para el desarrollo de las Larvas de *D. saccharalis*.

La preparación de los frascos consiste en depositar en ellos una dieta nutricionalmente balanceada y preparada en una sala donde se aplican medidas extremas de asepsia, con el objetivo de evitar la contaminación al ser esta sumamente atractiva para el desarrollo de diversos tipos de microorganismos como hongos y bacterias. Una vez obtenidas las posturas o huevos producidos por los adultos de *D. saccharalis*, se depositan en frascos de vidrio para que se desarrollen las larvas durante 14 días, antes de ser parasitadas por la hembra de *Cotesia flavipes*.

El Cuadro 4 y Figura 9 hacen referencia a la pérdida de frascos que se presentó durante el año 2019. De un total de 18,873 frascos preparados, fueron eliminados 1,355; equivalente a un 7% de pérdida del total de producción de frascos. Se produjeron 1,253 frascos menos que en el año 2018. La pérdida de frascos con dieta en comparación al año 2018, experimento un aumento de 13,3%, pasando de un promedio de 61 frascos eliminados en el 2018 a 108 frascos eliminados en el 2019.

**Cuadro 4.**  
**Cantidad de frascos producidos y eliminados durante el proceso de desarrollo de las larvas de *D. saccharalis*.**

Mes	Total de Frascos	% Pérdida de Frascos	Total Frascos Eliminados
Enero	638	1%	0
Febrero	1.724	5%	31
Marzo	1.486	10%	0
Abril	1.517	6%	4
Mayo	987	20%	16
Junio	2.036	16%	36
Julio	2.344	16%	282
Agosto	2.280	26%	259
Setiembre	1.615	36%	344
Octubre	1.787	29%	191
Noviembre	1.632	26%	137
Diciembre	827	29%	55
<b>Total</b>	<b>18.873</b>	<b>7%</b>	<b>1,355</b>
<b>Promedio 2019</b>	<b>1.573</b>	<b>18,3%</b>	<b>108</b>
<b>Promedio 2018</b>	<b>1.677</b>	<b>5%</b>	<b>61</b>



**Figura 9.** Porcentaje de Pérdida de Frascos con larvas para parasitación.

### **1.3 Relación de los puparios de *Cotesia flavipes* con respecto a la cantidad y sexo de las avispas obtenidas.**

#### **Justificación.**

De los puparios de *Cotesia flavipes* se obtienen los adultos de este insecto, tanto hembras como machos, algunos no logran un buen desarrollo y son llamados fallidos. Las hembras son utilizadas para parasitar las larvas de *Diatraea*, y los machos son indispensable para copular las hembras tanto en el laboratorio como en el campo una vez que estas son liberadas. Por lo tanto, es importante obtener una mayor cantidad de hembras que de machos y su relación debe ser de 2,5 hembras por macho para tener mayor eficiencia en la parasitación.

#### **Objetivo.**

Clasificar las avispas por sexo para estimar la cantidad y capacidad de parasitismo de cada lote.

## Procedimiento.

Para este análisis se toma una muestra al azar de 10 pupas por cada lote producido y se deja que las avispas emerjan. Una vez que mueren, son clasificadas en hembras, machos y no nacidas (fallidas). Posteriormente se contabilizan y se estima la cantidad de avispas que se obtendría por vaso para ese lote específicamente y se hace la relación de hembras por cada macho.

## Resultados.

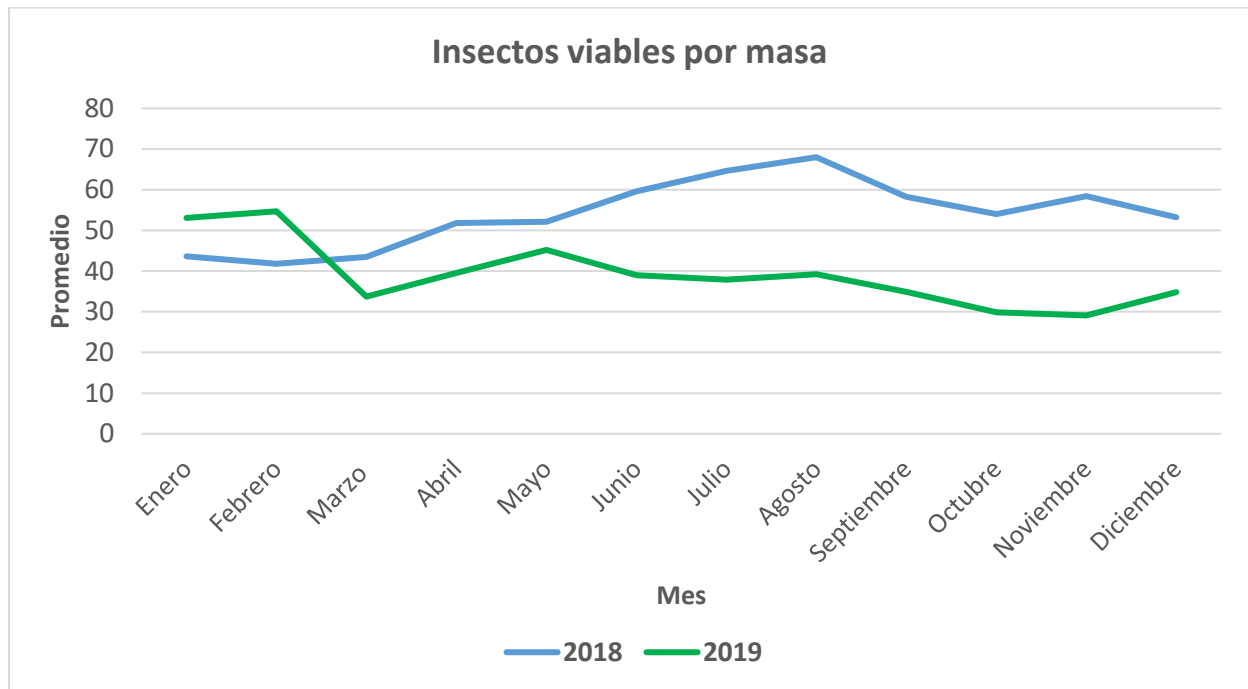
### 1) Cantidad de individuos viables y fallidos por masa.

La comparación que se efectúa entre el año 2018 y el 2019 (Cuadro 5), nos indica que los individuos viables (individuos que si nacen del pupario), en el periodo del 2019, fue en promedio de 39 individuos viables por masa y 54 individuos viables por masa en el 2018. Al contabilizar los individuos fallidos, se obtiene en el 2019 un promedio de 15,8, mientras que en el año 2018 el promedio fue de 15,2 fallidos por masa. En la figura 10 se representa gráficamente los promedios de individuos viables por masa anteriormente mencionados. Se puede observar que en el año 2019, el mes de febrero reportó el mayor promedio de insectos viables y el mes de noviembre el menor promedio, mientras que en el año 2018 fue en el mes de agosto donde se presentó el mayor promedio de insectos viables por masa y el menor promedio se presentó en el mes de febrero.

**Cuadro 5.**  
**Comparación de datos obtenidos en los conteos de masas de *Cotesia flavipes***  
**y el porcentaje de individuos fallidos en el año 2018 y 2019.**

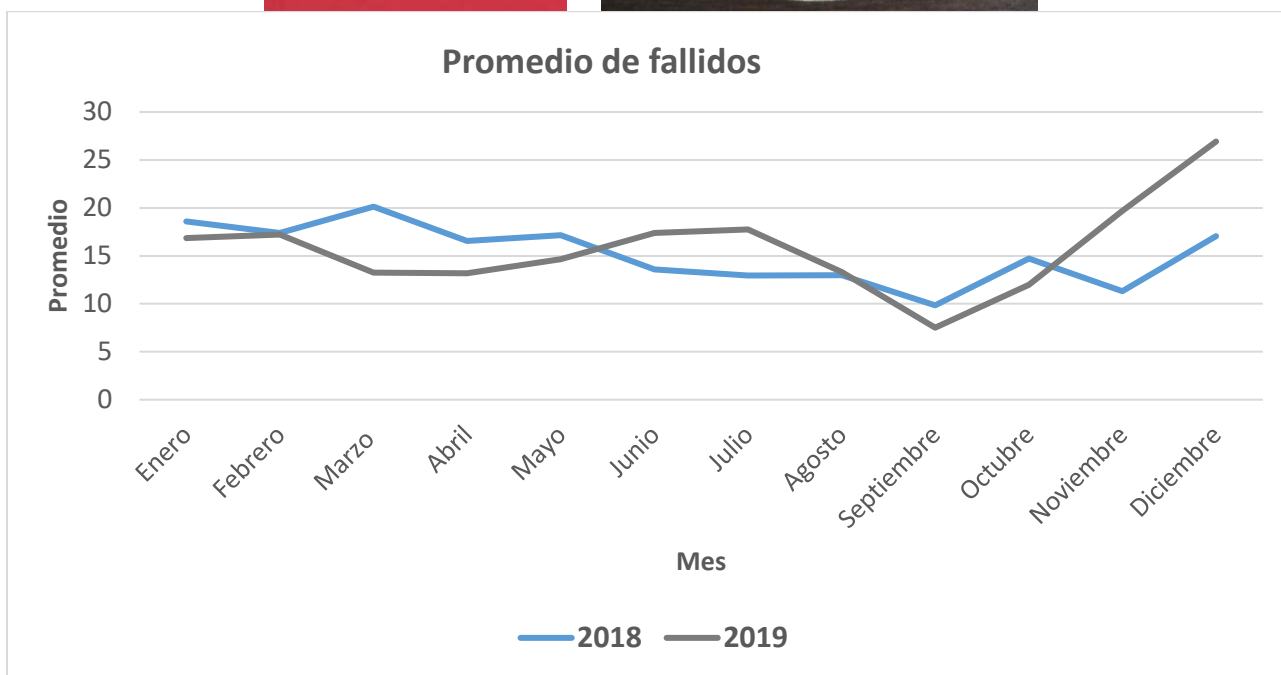
Mes	Promedio de insectos viables por masa		Promedio de fallidos por masa	
	2018	2019	2018	2019
Enero	43,6	53,06	18,6	16,85
Febrero	41,8	54,70	17,4	17,23
Marzo	43,5	33,76	20,13	13,24
Abril	51,8	39,57	16,54	13,18
Mayo	52,1	45,17	17,14	14,64
Junio	59,6	39,01	13,6	17,38
Julio	64,6	37,87	12,94	17,74
Agosto	68,0	39,25	12,98	13,32
Septiembre	58,3	34,90	9,84	7,51

<b>Octubre</b>	54,0	29,87	14,72	11,98
<b>Noviembre</b>	58,4	29,10	11,32	19,7
<b>Diciembre</b>	53,2	34,82	17,04	26,92
<b>PROMEDIO</b>	54,1	39,3	15,2	15,8
<b>Desviación estándar</b>	8,28	8,13	3,11	4,79



**Figura 10.** Comparación mensual del año 2018 y 2019, de insectos viables por masa.

En la Figura 11 se representa gráficamente el promedio de fallidos, en el año 2017 el mes de junio presentó el promedio más bajo, con un promedio de 10 y el mes de setiembre el valor más alto 25,08. Mientras que en el año 2018 el promedio más bajo se reportó en el mes de setiembre con 9,84 y el más alto fue en marzo con un promedio de 20,13.



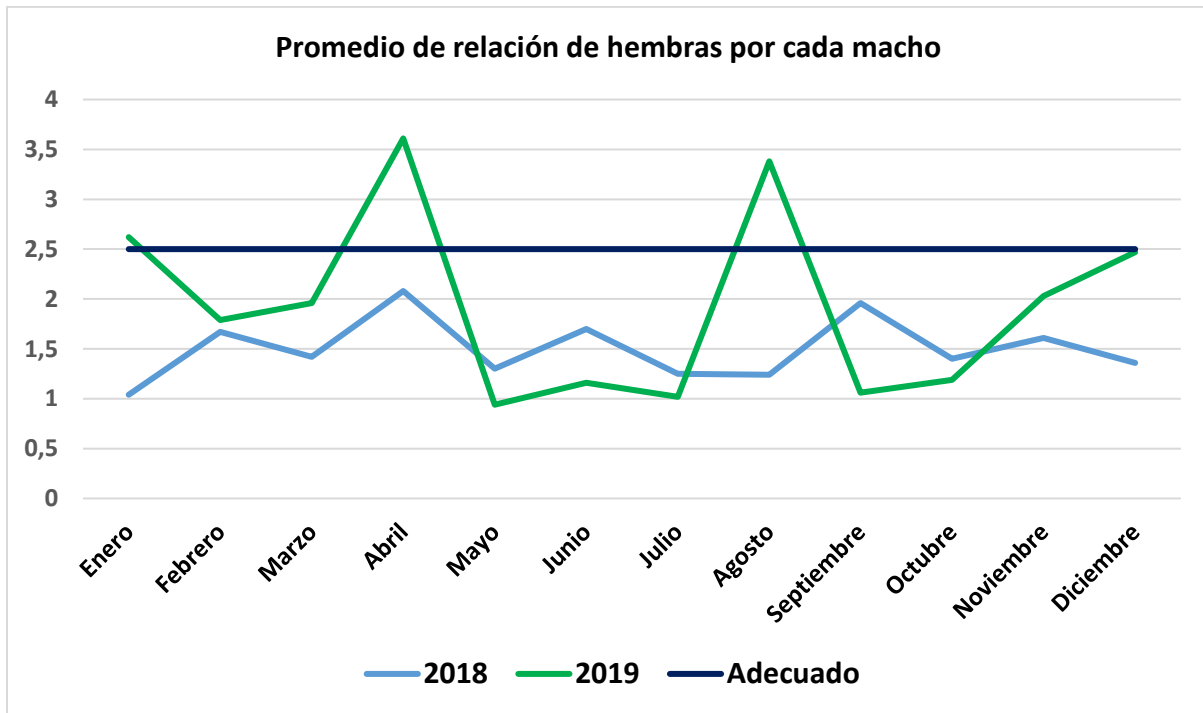
**Figura 11.** Comparación del porcentaje de fallidos en las masas, obtenidas en los años 2018 y 2019.

## 2) Relación entre la cantidad de hembras y machos emergidos de las masas de *C. flavipes*.

El promedio de hembras obtenidas por cada macho durante el año 2018 (Cuadro 6) fue de 1,5, mientras que en el año 2019 el promedio fue de 1,94 este aumento de 0,44 es significativo, ya que lo ideal es una mayor cantidad de hembras que de machos y que su relación sea de 2,5 hembras por macho para una mayor eficiencia en la parasitación. En la Figura 12 se representan gráficamente estos promedios, incluyendo el promedio ideal, lo cual permite observar que en el año 2019 en los meses de enero, abril y agosto se superó el promedio adecuado y el mes de diciembre se mantuvo en este promedio de 2,5 hembras por cada macho de *C. flavipes*.

**Cuadro 6.**  
**Relación de hembras y machos obtenidos en el año 2018 y el 2019.**

Mes	Promedio de relación de hembras por cada macho de <i>C. flavipes</i>		
	2018	2019	Adecuado
Enero	1,04	2,62	2,5
Febrero	1,67	1,79	2,5
Marzo	1,42	1,96	2,5
Abril	2,08	3,61	2,5
Mayo	1,3	0,94	2,5
Junio	1,7	1,16	2,5
Julio	1,25	1,02	2,5
Agosto	1,24	3,38	2,5
Septiembre	1,96	1,06	2,5
Octubre	1,4	1,19	2,5
Noviembre	1,61	2,03	2,5
Diciembre	1,36	2,47	2,5
<b>Promedio</b>	<b>1,50</b>	<b>1,94</b>	<b>2,5</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>0,31</b>	<b>0,93</b>	



**Figura 12.** Comparación mensual de la relación hembras por macho para el 2018 y 2019.

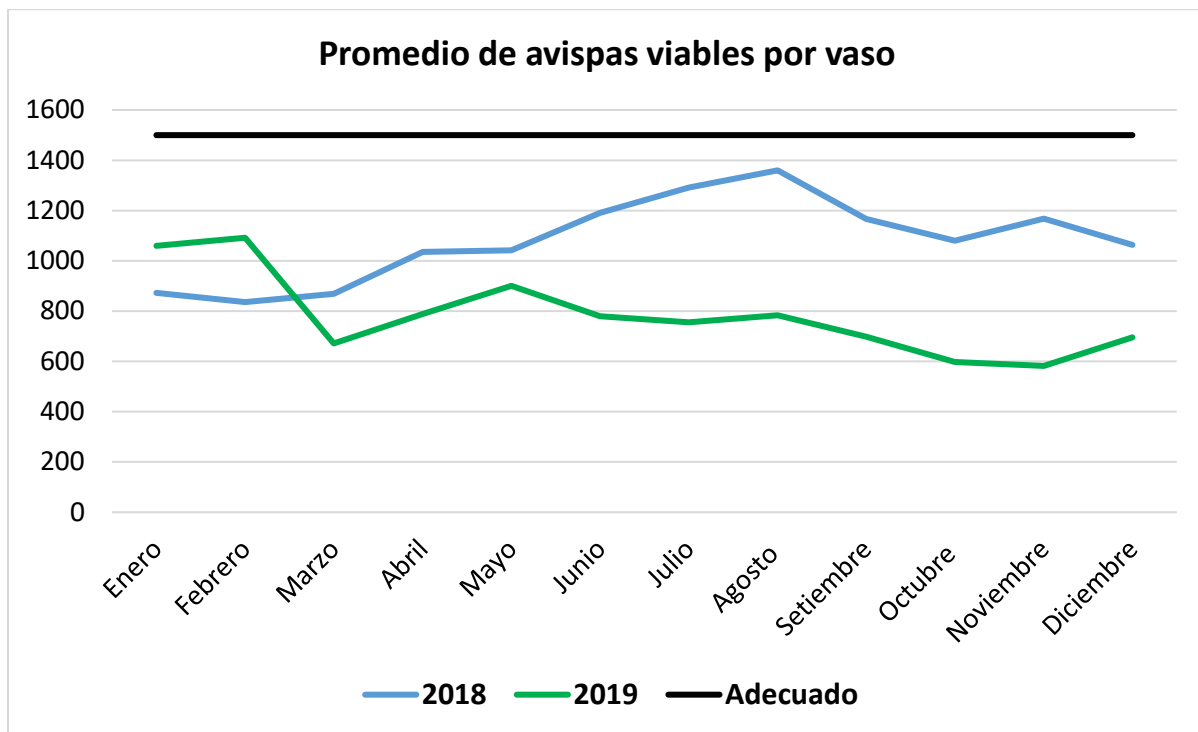
### 3) Cantidad de individuos de *C. flavipes* viables por vaso.

En el Cuadro 7 se presenta por mes la cantidad promedio de avispas de *C. flavipes* con capacidad de parasitación que contiene cada vaso de producto para su liberación en el campo y el promedio adecuado que es de 1.500 avispas por vaso.

**Cuadro 7.**  
**Promedio de *Cotesia flavipes* viables por cada vaso producido.**

Mes	Promedio de avispas viables por vaso		
	2018	2019	Adecuado
Enero	872	1.060	1.500
Febrero	836	1.092	1.500
Marzo	869	672	1.500
Abril	1.036	788	1.500
Mayo	1.042	900	1.500
Junio	1.191	780	1.500
Julio	1.292	756	1.500
Agosto	1.360	784	1.500
Setiembre	1.167	698	1.500
Octubre	1.080	598	1.500
Noviembre	1.168	582	1.500
Diciembre	1.063	696	1.500
<b>Total</b>	<b>12.975</b>	<b>9.406</b>	
<b>Promedio</b>	<b>1.081</b>	<b>784</b>	
<b>Desviación estándar</b>	<b>165,6</b>	<b>161,9</b>	

Los datos obtenidos en el año 2018, revelan que se obtuvo en promedio 1,081 individuos por vaso, mientras que el año 2019 obtuvo un promedio de 784 individuos por vaso. En la Figura 13 se puede apreciar esta disminución en el promedio de avispas viables por vaso que se presentó en el 2019, únicamente los promedios de avispas viables por vaso de enero y febrero superaron a los del año 2018.



**Figura 13.** Comparación de individuos viables por vaso entre el año 2018 y el 2019.

## 2. Control de Calidad en el proceso de producción de Hongos Entomopatógenos.

### 2.1. Revisión de Matrices líquidas para la inoculación de bolsas de arroz.

#### Justificación.

Para reproducir los hongos, es necesario inocular con las esporas de los mismos un medio nutritivo que permita rápidamente su crecimiento y esporulación en condiciones asépticas para que mantenga su pureza. El proceso de inoculación se realiza en un Erlenmeyer de vidrio que contiene el medio de cultivo líquido y las esporas. A pesar de seguir todos los procedimientos para evitar que las matrices se contaminen algunas son invadidas por otros hongos y bacterias, que obligan irremediablemente a su descarte, incrementando con ello una importante reducción en la cantidad de bolsas con arroz inoculadas.

## Objetivo.

Analizar y descartar las matrices líquidas que se encuentran contaminadas con patógenos.

## Procedimiento.

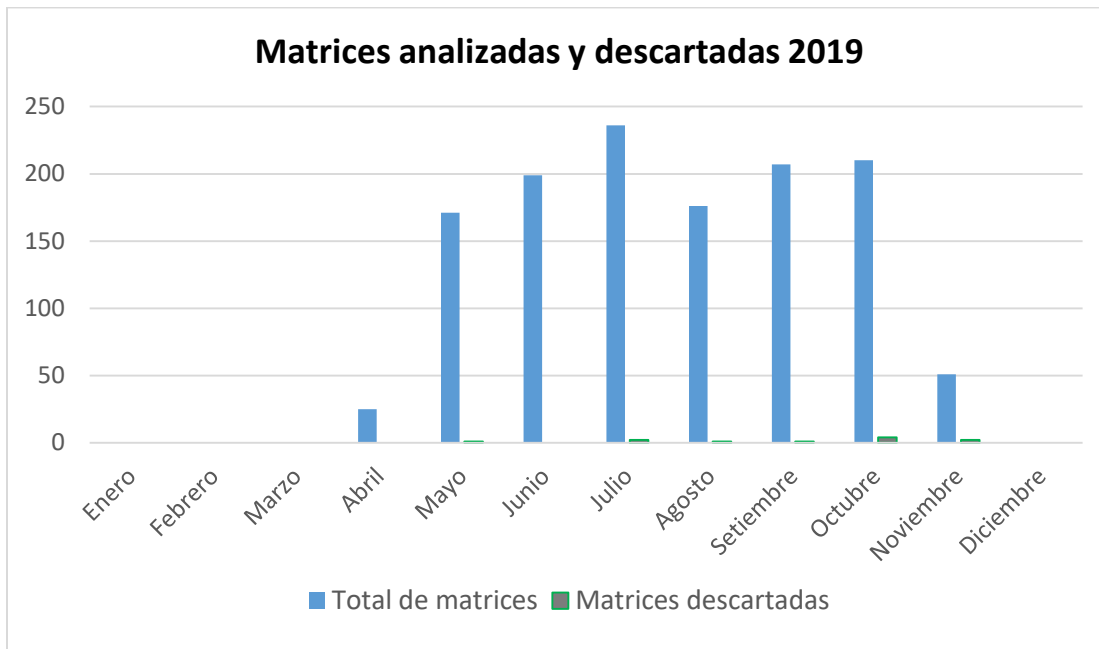
El primer paso en el proceso de producción es la revisión de las matrices, la cual se realiza posterior a su preparación. Las matrices son preparadas aproximadamente 7 días antes de ser inoculadas con el sustrato (arroz). Dicha preparación consiste en colocar una porción del hongo en el medio líquido (matriz), dejando en agitación constante durante 7 días para que se reproduzca el hongo. De cada matriz preparada se toma una muestra y se siembra en un plato Petri que contiene medio de cultivo PDA, estas placas inoculadas con las muestras de las matrices líquidas que se pretenden reproducir, son enviadas al laboratorio de Control de Calidad donde serán incubadas durante 8 días para evaluar la pureza de las mismas. Una vez determinada su pureza se da la indicación al personal del laboratorio ya sea de reproducir o descartar alguna de las matrices según sea el resultado de la evaluación por parte de control de calidad.

## Resultados.

**Cuadro 8.**  
**Matrices analizadas y descartadas en el periodo 2019 con su respectivo porcentaje de pérdida y comparación con el año 2018.**

Mes	Total de Matrices	Matrices descartadas	Matrices utilizadas	% de pérdida 2019	% de pérdida 2018
Enero	0	0	0	0	5,49
Febrero	0	0	0	0	0
Marzo	0	0	0	0	0
Abril	25	0	25	0	0
Mayo	171	1	170	0,58	0
Junio	199	0	199	0	1,89
Julio	236	2	234	0,85	3,45
Agosto	176	1	175	0,57	3,45
Setiembre	207	1	206	0,49	12,5
Octubre	210	4	206	2,63	5,34
Noviembre	51	2	49	4,08	4,08
Diciembre	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1.275</b>	<b>11</b>	<b>1.264</b>	<b>0,86</b>	<b>8,47</b>
<b>Promedio</b>	<b>106,25</b>	<b>0,92</b>	<b>105,33</b>	<b>0,77</b>	<b>3,02</b>
<b>Desv. Estándar</b>	<b>95,84</b>	<b>1,19</b>	<b>95,15</b>	<b>1,28</b>	<b>3,69</b>

En el año 2019 se analizaron un total de 1,275 matrices y se descartaron por contaminación 11 (Cuadro 8 y Figura 14). Esto provocó un porcentaje de pérdida en esta etapa del proceso de un 0,86 %, disminuyendo en un 7,61% en comparación al año 2018. En el mes de septiembre de 2018 se reportó el mayor porcentaje de pérdida (12,5%) y en el año 2019, fue el mes de noviembre el que presentó el mayor porcentaje de pérdida 4,08 % (Figura 15).



**Figura 14.** Total de matrices analizadas y descartadas en el año 2019.

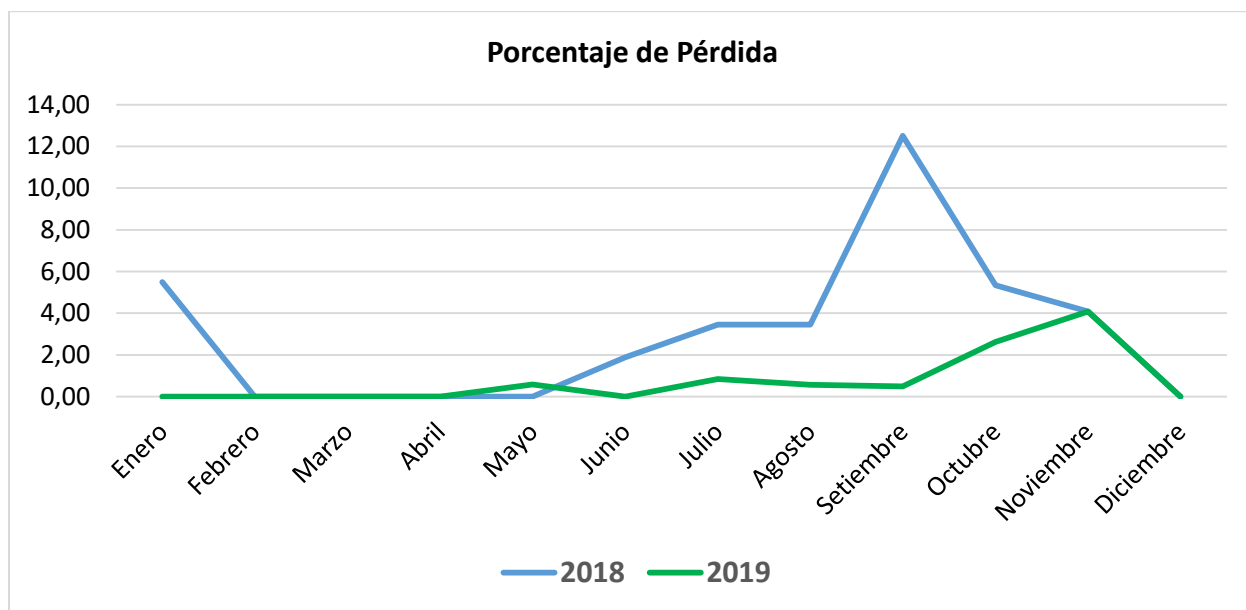


Figura 15. Comparación del porcentaje de pérdida de matrices líquidas del año 2018 y 2019

## 2.2. Determinación de la concentración de conidios, pureza microbiológica y viabilidad de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

### Justificación.

La concentración de conidios, la viabilidad y pureza de los hongos entomopatógenos son parámetros muy importantes de valorar en el laboratorio de control de calidad, esto para asegurar su capacidad de infestación de los organismos a controlar. Los conidios son las estructuras responsables de la capacidad de parasitación del hongo, por lo que conocer la cantidad y viabilidad de los mismos en cada lote, permite estimar la dosificación por hectárea de hongo necesaria para ejercer un control efectivo de la plaga a controlar.

### Objetivo.

Determinar la concentración, viabilidad y pureza de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* como producto final para su aplicación en el campo.

## Procedimiento.

De la muestra de producto terminado (hongo) que ingresa al laboratorio se toma una muestra de aproximadamente 10 gramos y en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se disuelve cada muestra en 100 ml de agua de agua destilada autoclava con humectante para obtener la disolución madre, luego se realizan 4 diluciones seriadas cada una en 9 ml de agua destilada autoclavada con humectante, para después tomar una muestra de 10 microlitros de la tercera dilución y realizar el conteo de conidios. Esta labor se realiza por medio de un microscopio y una cámara de Neubauer. Una vez que se determina la concentración de conidios de la muestra analizada se procede a clasificar su nivel de calidad según el rango establecido por el laboratorio de control de calidad (figura 16). Posteriormente en la cámara de flujo laminar, se toma 100 microlitros de dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  de hongo y se inocula en placas Petri que contienen medio de cultivo. Estas placas Petri una vez inoculadas se almacenan en la incubadora, la placa Petri que será utilizada para determinar viabilidad (placa inoculada con dilución  $10^{-3}$ ) se almacena 18 horas y la que será utilizada para la determinación de pureza (placa inoculada con dilución  $10^{-4}$ ) se almacena durante 8 días. Trascorridas las 18 horas de las placas Petri en la incubadora, se procede a determinar su viabilidad, mediante el conteo de las esporas germinadas y las no germinadas. La pureza se determina contabilizando las unidades formadoras de colonias pertenecientes al lote analizado, como también las que no pertenecen al mismo, obteniendo así un porcentaje de pureza microbiológica.

Clasificación de calidad del hongo según la concentración de conidios	
1.Muy malo	$\leq 6,75 \times 10^8$
2.Malo	$> 6,75 \times 10^8 \leq 7,50 \times 10^8$
3.Regular	$> 7,50 \times 10^8 \leq 1,25 \times 10^9$
4.Bueno	$> 1,25 \times 10^9 \leq 2,00 \times 10^9$
5.Muy bueno	$> 2,00 \times 10^9 \leq 2,75 \times 10^9$
6.Excelente	$> 2,75 \times 10^9$

Figura 16. Clasificación de la calidad de las muestras según la concentración de conidios.

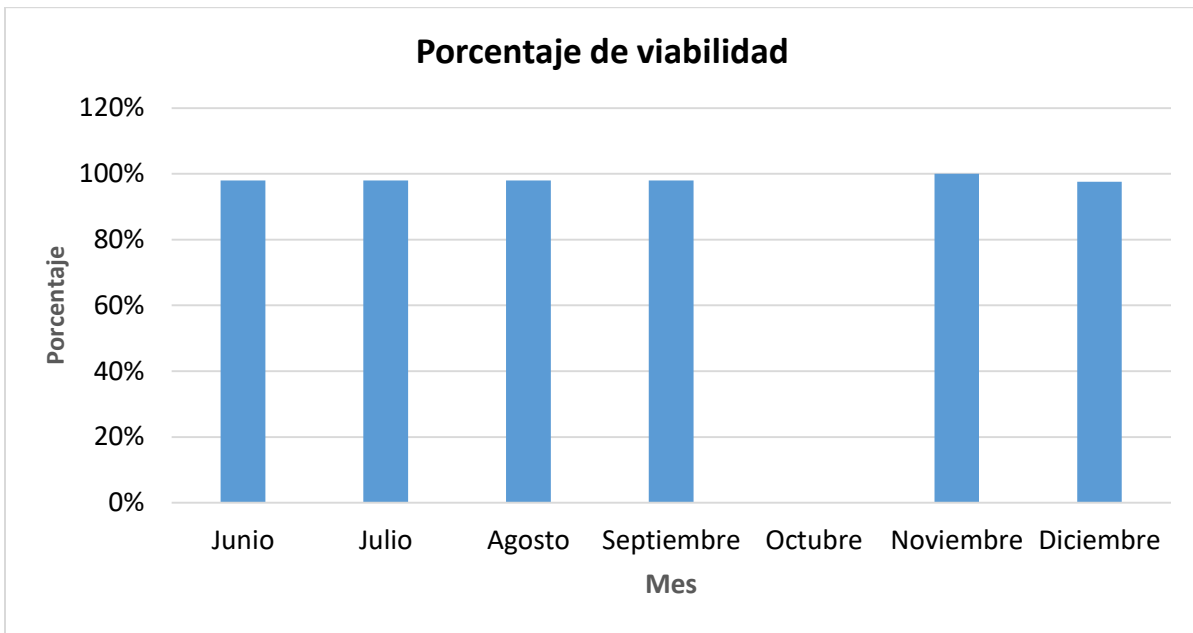
## Resultados.

### Beauveria bassiana.

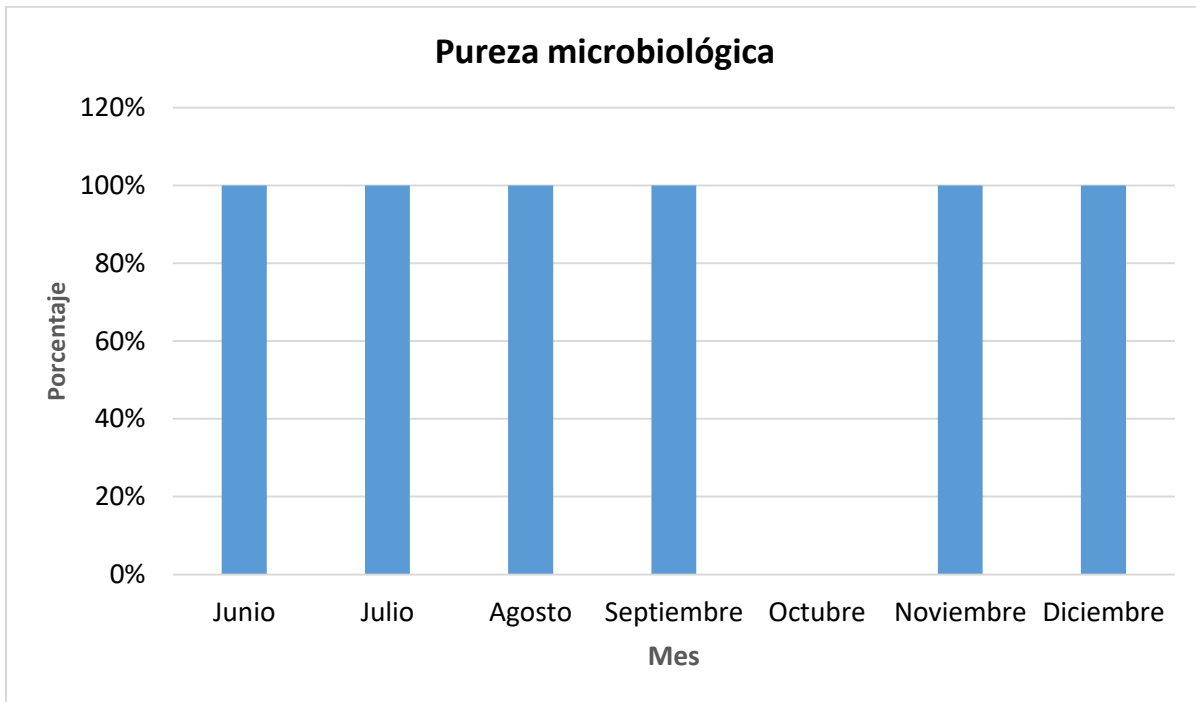
Se analizó un total de 33 lotes como producto final de *B. bassiana* durante los meses de junio, julio, agosto, septiembre, noviembre y diciembre obteniéndose una concentración promedio de  $7,12 \times 10^9$  conidios por gramo (Cuadro 9) la cual se clasifica como de calidad excelente de acuerdo a la figura 16. El porcentaje de viabilidad presentó un 98 % de conidios viables aumentando 3% en comparación al año 2018, en la Figura 17 se representa gráficamente los porcentajes de viabilidad de los meses en que hubo producción y por ende análisis de muestras, se puede observar que la viabilidad se mantuvo dentro del rango de 98%- 100%. La pureza microbiológica de *B. bassiana* presentó un aumento de un 3% en comparación al año 2018, con un porcentaje de 100% durante todos los meses de producción (Figura 18).

**Cuadro 9.**  
**Resultados obtenidos en el análisis de Control de calidad del hongo *B. bassiana* como producto final.**

Mes de análisis	Total de muestras	Concentración de conidios por gramo	% Viabilidad	% Pureza microbiológica
Enero	0		0%	0%
Febrero	0		0%	0%
Marzo	0		0%	0%
Abril	0		0%	0%
Mayo	0		0%	0%
Junio	3	4,63E+09	98%	100%
Julio	5	4,28E+09	98%	100%
Agosto	5	4,80E+09	98%	100%
Septiembre	9	2,90E+09	98%	100%
Octubre	0			0%
Noviembre	5	4,43E+09	100%	100%
Diciembre	6	2,17E+10	98%	100%
<b>Total de muestras</b>	<b>33</b>	-	-	-
<b>Promedio 2019</b>		<b>7,12E<sup>+09</sup></b>	<b>98%</b>	<b>100%</b>
<b>Promedio 2018</b>		<b>2,52 E<sup>+10</sup></b>	<b>95%</b>	<b>97%</b>



**Figura 17.** Comportamiento de conidios viables del hongo *B. bassiana*, correspondiente al año 2019.



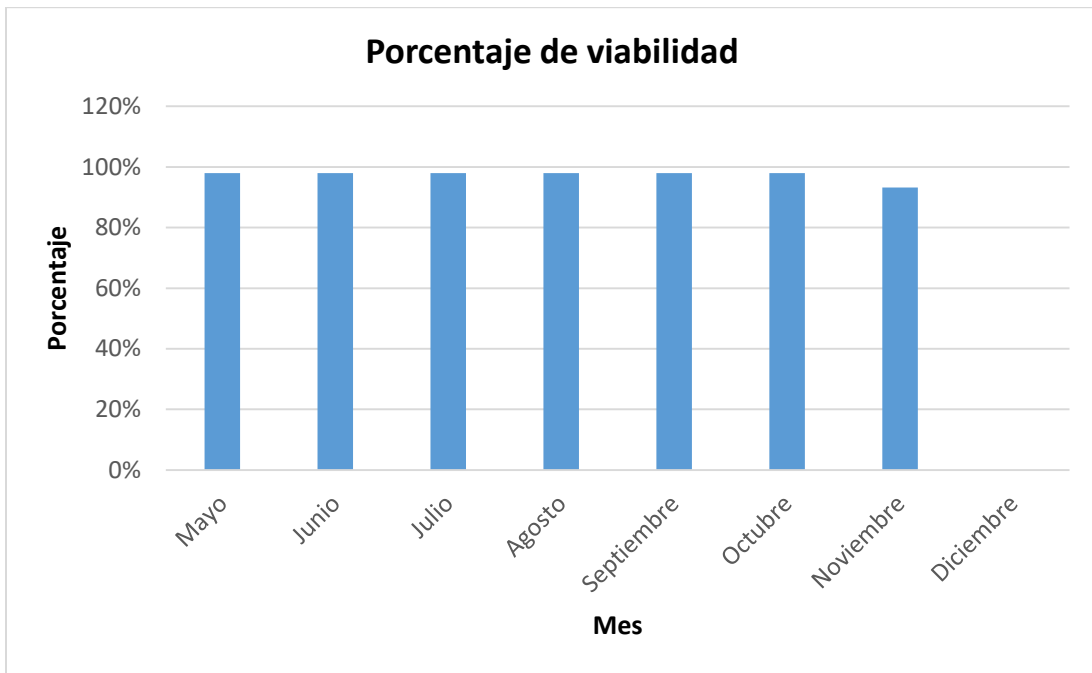
**Figura 18.** Comportamiento de la pureza microbiológica de los lotes de *B. bassiana*.

***Metarhizium anisopliae.***

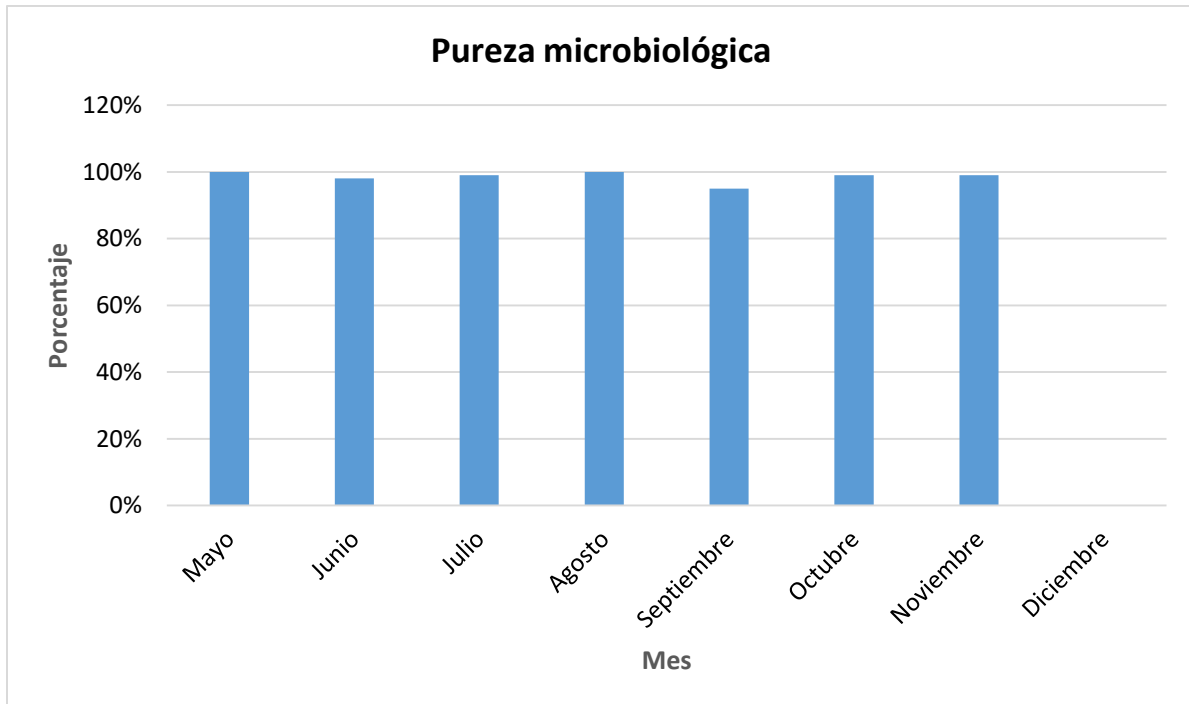
Se analizó un total de 76 muestras de *M. anisopliae* durante el periodo (Cuadro 10), de las cuales se obtuvo una concentración promedio de  $1,58 \times 10^9$  conidios por gramo clasificándose como calidad buena de acuerdo a la Figura 16. El porcentaje de viabilidad, se mantuvo en promedio en 97% igual al año 2018, la Figura 19 muestra que el mes de noviembre fue el que reportó el menor porcentaje. Con respecto a la pureza microbiológica, esta presentó un aumento de un 18% en comparación al año 2018 (Figura 20).

**Cuadro 10.**  
**Resultados obtenidos en el análisis del control de calidad del hongo *M. anisopliae* como producto final.**

Mes de análisis	Total de muestras	Concentración de conidios por gramo	% de Viabilidad	% Pureza microbiológica
Enero		0	0%	0%
Febrero		0	0%	0%
Marzo		0	0%	0%
Abril		0	0%	0%
Mayo	8	1,78E+09	98%	100%
Junio	10	1,72E+09	98%	98%
Julio	18	1,66E+09	98%	99%
Agosto	6	1,17E+09	98%	100%
Septiembre	13	1,33E+09	98%	95%
Octubre	10	1,41E+09	98%	99%
Noviembre	11	2,00E+09	93%	99%
Diciembre	0	0	0%	0%
<b>Total de muestras</b>	<b>76</b>	-	-	-
<b>Promedio 2019</b>		<b>1,58E<sup>+09</sup></b>	<b>97%</b>	<b>99%</b>
<b>Promedio 2018</b>		<b>3,47 E<sup>+10</sup></b>	<b>97%</b>	<b>81%</b>



**Figura 19.** Comportamiento de conidios viables del hongo *Metarhizium anisopliae*, durante los meses productivos del año 2019.



**Figura 20.** Comportamiento de la pureza microbiológica de los lotes de *M. anisopliae*, durante los meses productivos.

### 2.3. Medición de las pérdidas en el proceso de producción e inoculación de bolsas con sustrato (arroz)

#### Justificación.

El arroz se utiliza como sustrato para la inoculación de los hongos entomopatógenos. Durante el proceso de su preparación, el cual consta de tres etapas: cocción, embolsado e inoculado, el arroz se ve expuesto a ser contaminado por otros microorganismos. Por consiguiente, la implementación de medidas estrictas de asepsia es fundamental para evitar pérdidas.

**Objetivo.** Evaluar las pérdidas de bolsas inoculadas con los hongos y determinar las posibles causas de dicha contaminación.

#### Procedimiento.

La determinación de la pérdida de bolsas con sustrato inoculadas en el laboratorio, se realiza por medio de una revisión en el momento de la homogenización del hongo en los estantes. Si el hongo no logra esporular, el arroz puede ser reutilizado con el fin de aprovechar al máximo los insumos, pero si se contaminó se debe desechar.

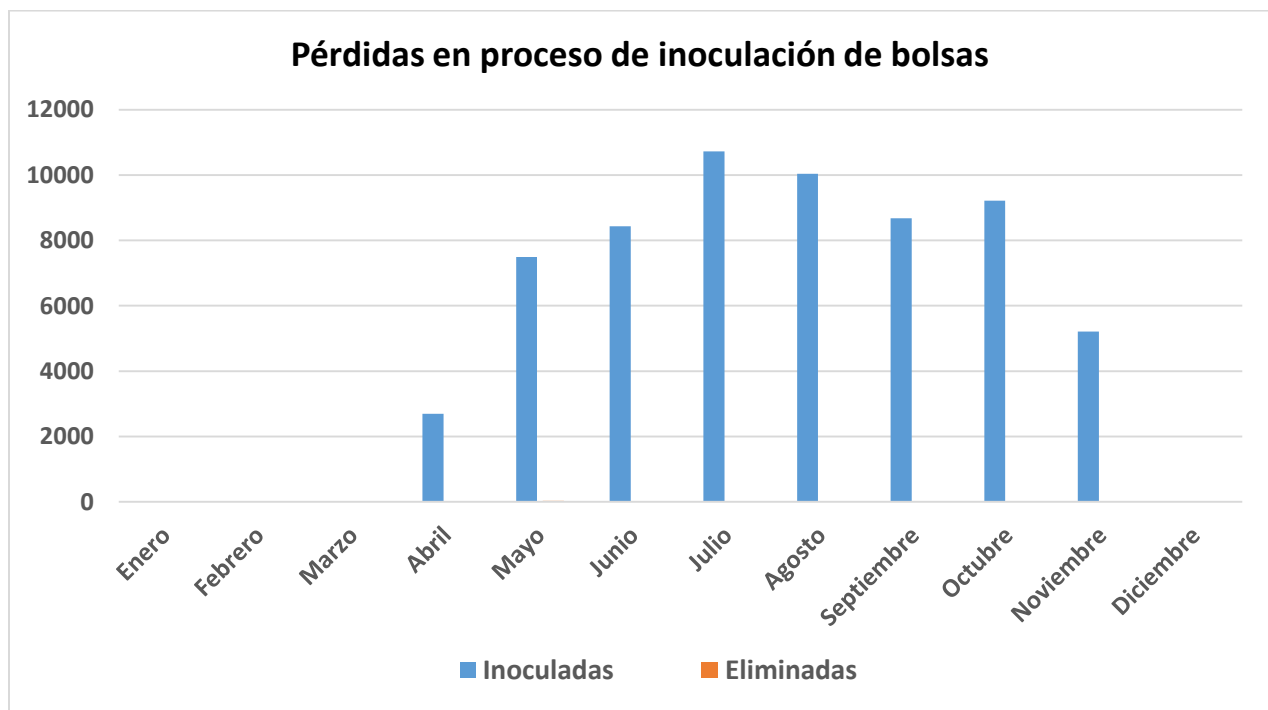
#### Resultados.

Al comparar el porcentaje de pérdidas del año 2018 con el del 2019 (Cuadro 11), se puede observar que hubo una disminución de 0,21%. Los meses de abril y mayo, fueron los que presentaron pérdida por contaminación o porque el hongo no esporuló. Abril reportó un porcentaje de pérdida de 0,85 % y mayo de 0,35 %. La Figura 21 muestra una representación gráfica de la cantidad de bolsas inoculadas mensualmente y la pérdida de las mismas.



**Cuadro 11.**  
**Cantidad de bolsas inoculadas y pérdidas en el proceso.**

<b>Pérdidas en el proceso de producción e inoculación de las Bolsas con sustrato (arroz)</b>			
<b>Mes</b>	<b>Bolsas inoculadas</b>	<b>Bolsas eliminadas (contaminadas o sin esporular)</b>	<b>% Pérdida</b>
Enero	0	0	0,00
Febrero	0	0	0,00
Marzo	0	0	0,00
Abril	2.695	23	0,85
Mayo	7.493	26	0,35
Junio	8.431	0	0,00
Julio	10.724	0	0,00
Agosto	10.040	0	0,00
Septiembre	8.679	0	0,00
Octubre	9.220	0	0,00
Noviembre	5.210	0	0,00
Diciembre	0	0	0,00
<b>Total</b>	<b>62.492</b>	<b>49</b>	<b>0,08</b>
<b>Promedio 2019</b>	<b>7.812</b>	<b>4</b>	<b>0,10</b>
<b>Promedio 2018</b>	<b>5.420</b>	<b>26</b>	<b>0,31</b>



**Figura 21.** Comportamiento mensual de las bolsas inoculadas y desechadas durante el año 2019.

### 3. Control de Calidad Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

#### 3.1. Pruebas de ELISA realizadas a las variedades de caña de azúcar a reproducir en Laboratorio de Cultivo Tejidos.

##### **Justificación.**

Las enfermedades de la hoja amarilla y mosaico de la caña de azúcar, son transmitidas por la semilla sexual de la caña de azúcar, por lo que el material que ingresa al laboratorio para su reproducción debe estar completamente libre de estos patógenos y así evitar su propagación por medio de la semilla a la caña de azúcar cultivada comercialmente. Para detectar la presencia de estas enfermedades, se debe realizar un análisis llamado ELISA (por el significado de sus siglas en inglés) y de esta manera asegurar la sanidad y calidad de las plántulas generadas en el laboratorio.

##### **Objetivo.**

Determinar la presencia del virus de hoja amarilla (ScYLV) y virus de mosaico (ScMV), en los ápices de las variedades de caña de azúcar que ingresan al laboratorio de cultivo de tejidos.

##### **Procedimiento.**

Se realiza un macerado de las muestras de hoja traídas de campo. El macerado se realiza agregando buffer de muestra y el extracto de la hoja se recolecta en viales de micro centrifuga y son refrigeradas hasta el día en que se realice el análisis. El procedimiento se realiza en 3 etapas (3 días), el primer día se preparan las placas con el Buffer Coating más el anticuerpo de detección y se dejan incubar por una noche. El segundo día se realiza el lavado de las placas y se procede a la colocación de los controles y las muestras que se hacen por duplicado para cada análisis (ScYLV y ScMV), las placas se colocan en cámara húmeda y se introducen en la estufa a 37°C hasta el siguiente día. El tercer día se realiza nuevamente un lavado de los pozos y se le coloca el anticuerpo de detección de la enfermedad correspondiente (Hoja amarilla o Mosaico), luego se deja incubar por 3 horas en la estufa; terminado este periodo se vuelve a lavar las placas y se coloca el Buffer Sustrato el cual genera la coloración de las

muestras, las placas se colocan nuevamente en cámara húmeda y en la estufa durante 1 hora y finalmente se realizan las lecturas de absorbancia.

### **Resultados.**

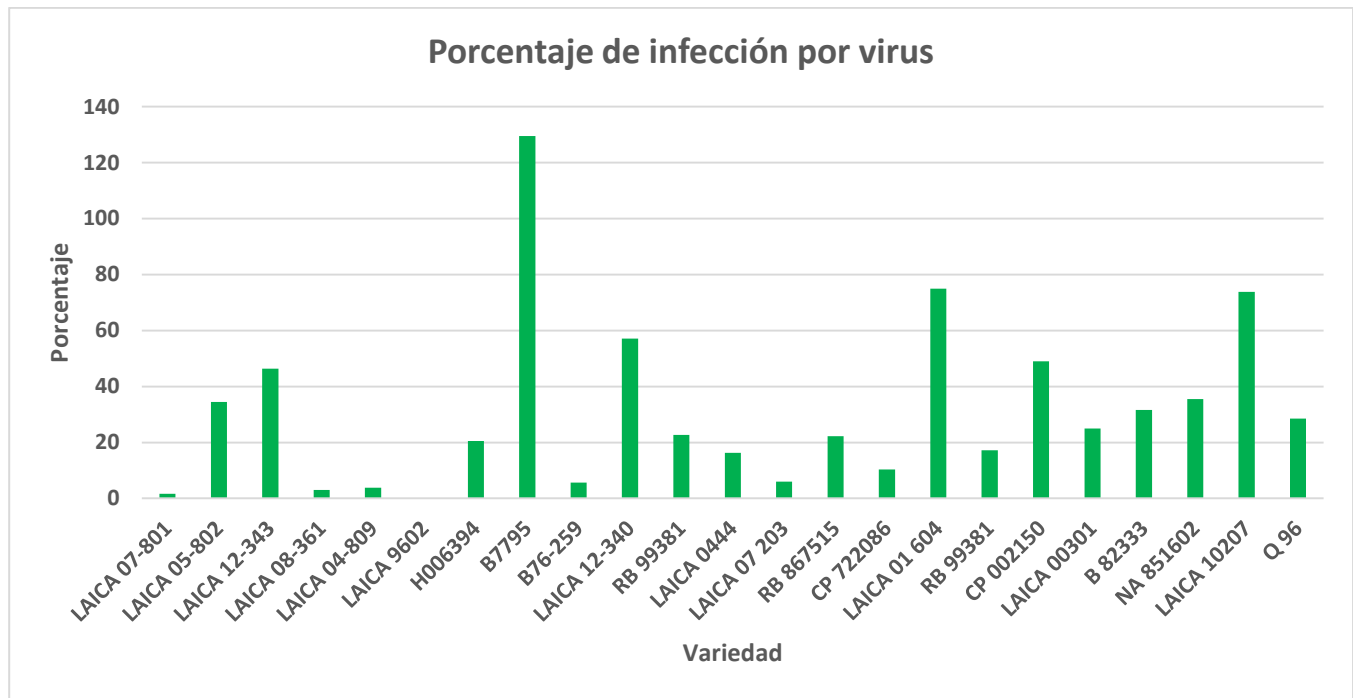
En el Cuadro 12 y Figura 22, se presentan las variedades analizadas durante el 2019. De un total de 1266 muestras analizadas, resultó contaminado por virus un 27,09% de las mismas. Como se observa la única variedad que no reportó infección de virus fue la LAICA 96-02 analizada en el mes de abril.



Cuadro 12.

Porcentaje de infección del “Virus de Hoja Amarilla” y “Virus de Mosaico “ obtenidos en los ápices que ingresan a reproducción en el laboratorio.

Fecha	Variedad	Muestras analizadas	Muestras con virus	Muestras libres de virus	% de infección
25/1/2019	LAICA 07-801	62	1	61	1,61
25/1/2019	LAICA 05-802	55	19	36	34,5
25/1/2019	LAICA 12-343	55	17	38	31
<b>TOTAL</b>		<b>172</b>	<b>37</b>	<b>135</b>	<b>21,51</b>
1/2/2019	LAICA 08-361	62	2	60	3
1/2/2019	LAICA 12-343	13	2	11	15,4
1/2/2019	LAICA 04-809	78	3	75	3,8
<b>TOTAL</b>		<b>153</b>	<b>7</b>	<b>146</b>	<b>4,58</b>
24/4/2019	LAICA 9602	53	0	53	0,0
24/4/2019	H 00-6394	73	15	58	20,5
24/4/2019	B77-95	46	39	7	84,8
<b>TOTAL</b>		<b>172</b>	<b>54</b>	<b>118</b>	<b>31,4</b>
10/5/2019	B76-259	35	2	33	5,7
10/5/2019	LAICA 12-340	34	5	29	14,7
10/5/2019	RB 99-381	22	5	17	22,7
10/5/2019	LAICA 04-44	43	7	36	16,3
<b>TOTAL</b>		<b>134</b>	<b>19</b>	<b>115</b>	<b>14,2</b>
10/7/2019	LAICA 07-203	33	2	31	6,06
10/7/2019	RB 86-7515	9	2	7	22,2
<b>TOTAL</b>		<b>42</b>	<b>4</b>	<b>38</b>	<b>9,52</b>
23/8/2019	CP 72-2086	29	3	26	10,34
<b>TOTAL</b>		<b>29</b>	<b>3</b>	<b>26</b>	<b>10,34</b>
23/10/2019	B 77-95	38	17	21	44,74
23/10/2019	LAICA 01-604	4	3	1	75
23/10/2019	LAICA 10-207	65	48	17	73,85
23/10/2019	LAICA 12-340	73	31	42	42,47
<b>TOTAL</b>		<b>180</b>	<b>99</b>	<b>81</b>	<b>55,00</b>
4/12/2019	RB 99-381	58	10	48	17,24
12/12/2019	CP 00-2150	51	25	26	49,02
12/12/2019	Q 96	35	10	25	28,57
12/12/2019	LAICA 00-301	68	17	51	25,00
18/12/2019	B 82-333	79	25	54	31,65
18/12/2019	NA 85-1602	93	33	60	35,48
<b>TOTAL</b>		<b>384</b>	<b>120</b>	<b>264</b>	<b>31,25</b>
<b>TOTAL 2019</b>		<b>1.266</b>	<b>343</b>	<b>923</b>	<b>27,09</b>



**Figura 22.** Comportamiento del porcentaje de infección de virus en las variedades evaluadas en el 2019

### 3.2. Cuantificación de las pérdidas de plántulas de Cultivo *in Vitro* en los invernaderos.

#### Justificación.

Las plántulas producidas en el laboratorio deben ser aclimatadas y posteriormente llevadas a un invernadero para sembrarlas en bandejas donde se mantendrán hasta el desarrollo adecuado para ser trasladadas a campo.

Diversos factores: hormonales, ambientales y de manejo provocan pérdidas de las plántulas en las bandejas después del trasplante, incrementando con ello los costos de producción y disminuyendo además la capacidad de entrega de las plántulas en las cantidades requeridas por los demandantes de las mismas. Por lo tanto, es de suma importancia analizar y conocer el porqué de estas pérdidas en el invernadero, lo que da fundamento a realizar diversas investigaciones que ayuden a futuro a minimizar dentro de lo posible esta situación.

## **Objetivo.**

Cuantificar las pérdidas que se dan en la etapa de crecimiento en el invernadero y analizar los posibles factores que inciden en estas pérdidas.

## **Resultados.**

Los datos mostrados en el cuadro 15 fueron recolectados el 27 de diciembre de 2019 (fecha de último inventario). Se contabilizaron las bandejas sembradas por cada variedad, para así obtener el número de plantas sembradas. Cabe señalar que cada bandeja permite la siembra de 50 plántulas.

En el Cuadro 13 se ve reflejado el porcentaje de pérdidas en invernadero, donde se estimó un 20,02% de plántulas pérdidas. Para asegurar un desarrollo óptimo de las plantas en campo, no se debe superar 60 días de permanencia de las plantas en invernadero ya que en este periodo de tiempo alcanzan las condiciones fisiológicas óptimas para ser establecidas en campo. En la Figura 23.a se puede observar una bandeja con plantas que superan los 60 días de siembra y aún permanecían en invernadero en el II semestre de 2019.



Cuadro 13.

## Plántulas de diferentes variedades, sembradas y pérdidas en condiciones de invernadero

Variedad	Fecha de siembra	Bandejas	N° de plantas	Ubicación(# de invernadero)	Estimación (pérdida de plantas)	% Perdida	Fecha de último inventario
LAICA 07-20	18/07/2017	3	150	5	145	96,7	27/12/2019
CP 00-2150	18/07/2017	12	600	5	600	100,0	27/12/2019
CP 72-2086	10/07/2017	13	650	5	600	92,3	27/12/2019
LAICA 07-20	28/02/2018	16	800	5	265	33,1	27/12/2019
LAICA 04-809	01/03/2018	6	300	5	32	10,7	27/12/2019
LAICA 07-20	16/03/2018	17	850	5	262	30,8	27/12/2019
LAICA 07-20	18/03/2018	4	200	5	32	16,0	27/12/2019
B 77-95	21/05/2018	14	700	5	198	28,3	27/12/2019
LAICA07-09	22/05/2018	13	650	5	187	28,8	27/12/2019
LAICA 07-09	28/05/2018	20	1.000	5	193	19,3	27/12/2019
LAICA 07-09	29/05/2018	14	700	5	142	20,3	27/12/2019
LAICA 07-09	31/05/2018	20	1.000	5	166	16,6	27/12/2019
LAICA07-09	01/06/2018	9	450	5	315	70,0	27/12/2019
TW10-8134	18/06/2018	18	900	5	110	12,2	27/12/2019
B 77-95	06/07/2018	12	600	5	149	24,8	27/12/2019
TW 10-8134	30/07/2018	4	200	5	20	10,0	27/12/2019
LAICA 12-344	31/07/2018	8	400	5	37	9,3	27/12/2019
LAICA10-804	03/08/2018	9	450	5	123	27,3	27/12/2019
SABORIANA	08/08/2018	12	600	5	58	9,7	27/12/2019
SABORIANA	10/08/2018	32	1.600	5	117	7,3	27/12/2019
SABORIANA	13/08/2018	28	1.400	5	118	8,4	27/12/2019
SABORIANA	17/08/2018	52	2.600	5	309	11,9	27/12/2019
SABORIANA	20/08/2018	30	1.500	5	136	9,1	27/12/2019
CC 01-1940	22/08/2018	20	1.000	5	30	3,0	27/12/2019
CC 01-1940	27/08/2018	12	600	5	50	8,3	27/12/2019
CC 01-1940	29/08/2018	20	1.000	5	25	2,5	27/12/2019
CC 01-1940	31/08/2018	28	1.400	5	46	3,3	27/12/2019
<b>TOTAL</b>		<b>446</b>	<b>22.300</b>	<b>5</b>	<b>4.465</b>	<b>20,02</b>	<b>27/12/2019</b>



**Figura 23.** (a) Bandejas con plantas que exceden edad óptima de trasplante.

### **3.3 Cuantificación e identificación de pérdidas de frascos en la reproducción de plántulas *in vitro***

#### **Justificación.**

La importancia de mejorar la eficiencia en los procesos de producción, lleva a verificar e investigar el porqué de las pérdidas en los procesos, con el fin de mejorar la calidad de los productos obtenidos y disminuir las pérdidas en el proceso de reproducción *in vitro* de plántulas.

#### **Objetivo.**

Identificar los principales problemas que causan la pérdida de frascos con plántulas, en las diferentes etapas de producción dentro del laboratorio de cultivo de tejido.

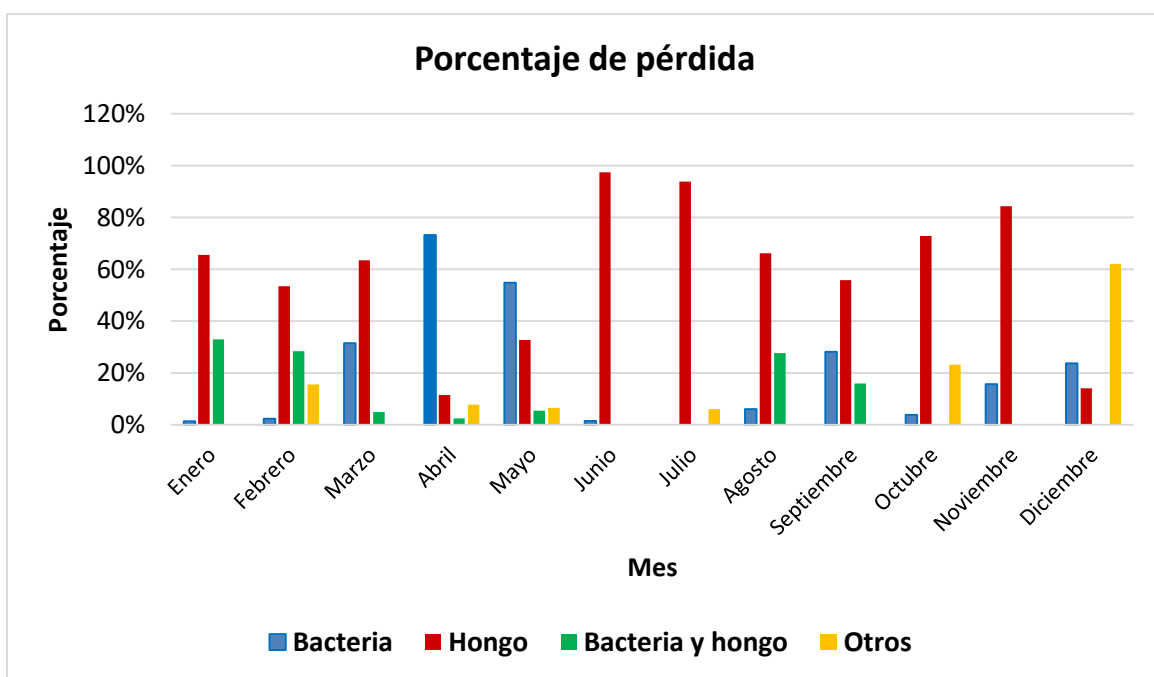
#### **Resultados.**

En el Cuadro 14 se puede observar que durante el año 2019 fueron sembrados 125.222 frascos inicialmente, de estos fueron eliminados 6.624 para obtener un total de 147.083 frascos. En cada frasco se siembra un total de 16 plántulas, por lo tanto en el año 2019 se cultivaron 2.344.025 plántulas. El porcentaje de pérdida en promedio fue de 4,6%. En la Figura 24 se representa gráficamente los porcentajes de pérdida de cada mes y sus respectivos agentes causales (hongo, bacteria, hongo y bacteria, otros). El porcentaje de rendimiento en promedio fue de 95,3%. En la Figura 25 se puede

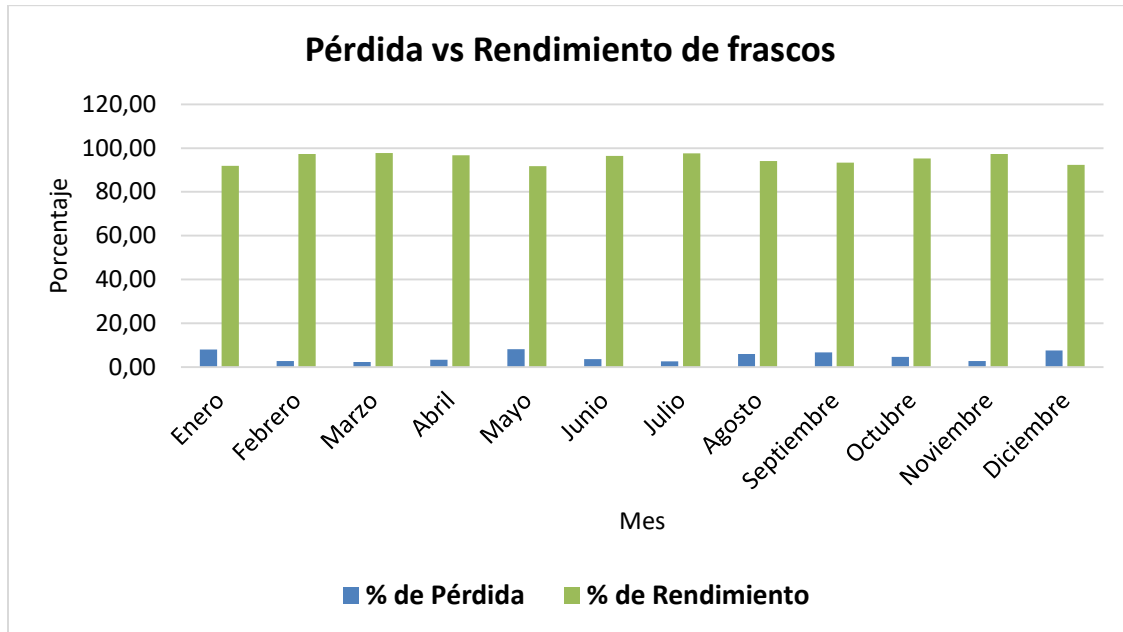
observar que el porcentaje de rendimiento en este año, siempre se mantuvo por arriba de un 90% y el porcentaje de pérdida se mantuvo por debajo del 10%.

**Cuadro 14.**  
**Pérdidas de plantas en frascos por contaminación en laboratorio de Cultivo de tejidos.**

Mes	N° Frascos Iniciales	N° Frascos Eliminados	Tipo de Pérdida				Total de frascos (Inventario)	Total de plantas	% de Pérdida	% de Rendimiento
			Bacteria	Hongo	Bacteria y hongo	Otros				
Enero	6.380	515	1%	65,6%	33%	0%	5.865	93.840	8,02	91,90
Febrero	7.772	211	2%	54,0%	28%	16%	7.561	120.976	2,70	97,30
Marzo	8.713	200	31,5%	63,5%	5%	0%	8.513	136.208	2,3	97,7
Abril	7.461	243	73,2%	11,5%	2,5%	7,8%	7.218	115.488	3,25	96,75
Mayo	9.939	826	54,9%	32,8%	5,4%	6,5%	9.113	145.808	8,2	91,73
Junio	9.141	320	1,6%	97,5%	0%	0%	8.821	141.136	3,6	96,4
Julio	6.344	212	0%	93,9%	0%	6%	11.474	183.584	2,52	97,61
Agosto	18.448	1.138	6,1%	66,3%	28%	0%	17.310	276.960	5,87	94,13
Septiembre	16.707	1.174	28,2%	55,9%	16%	0%	15.533	246.440	6,68	93,32
Octubre	12.019	549	3,8%	72,9%	0%	23%	11.470	183.520	4,69	95,31
Noviembre	8.808	242	15,7%	84,3%	0%	0%	8.566	134.791	2,72	97,28
Diciembre	13.490	994	23,7%	14,1%	0%	62%	35.639	565.274	7,60	92,40
<b>Total</b>	<b>125.222</b>	<b>6.624</b>					<b>147.083</b>	<b>2.344.025</b>		
<b>Promedio</b>	<b>10.435</b>	<b>552</b>	<b>20%</b>	<b>59%</b>	<b>10%</b>	<b>10%</b>	<b>12.257</b>	<b>195.335,4</b>	<b>4,68</b>	<b>95,30</b>



**Figura 24.** Porcentaje de pérdida de frascos del año 2019.



**Figura 25.** Relación entre el porcentaje de pérdida de frascos y su rendimiento.

#### 4. Asepsia en los laboratorios.

##### 4.1 Plaqueo para determinar nivel de contaminación aérea en las diferentes áreas de los laboratorios de *Cotesia flavipes*, hongos entomopatógenos y cultivo de tejidos.

###### Justificación.

Los laboratorios en general están expuestos a la contaminación por hongos y bacterias, debido al ingreso del personal y al manejo en los mismos de medios de cultivo o dietas que son susceptibles al ataque de patógenos. Un laboratorio contaminado representa en la mayoría de los casos paralizar actividades y el costo de su descontaminación es alto y pondrá en riesgo la calidad de sus productos biológicos.

###### Objetivos.

Identificar hongos y bacterias que pueden llegar a ser los causantes de contaminación en los diferentes procesos realizados en la producción de los laboratorios.

### Procedimiento.

Se preparan platos Petri con medio de cultivo (PDA) con al menos 8 días de anticipación y se mantienen en la incubadora. El día en que se realizará el plaqueo de los laboratorios, se revisan las placas Petri y en caso de que alguna esté contaminada se desecha. Posteriormente se rotulan las placas con el nombre del laboratorio, área por analizar y fecha. El laboratorio de hongos entomopatógenos es el último en donde se realiza plaqueo, esto para evitar el transporte de esporas a los demás laboratorios. En cada área, se abre el plato Petri correspondiente con medio de cultivo y se deja expuesto por un tiempo aproximado de 5 minutos, posteriormente se cierra y se sella cada plato Petri con parafilm, y se colocan en la incubadora para dejarlos crecer 8 días y así ver los contaminantes presentes en cada laboratorio. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se procede a hacer conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada hongo que creció y de acuerdo al número de colonias se clasifica el nivel de contaminación (Figura 26).

Clasificación (cantidad de UFC)	
SIN CONTAMINATES	0 UFC
BAJO	1-3 UFC
MEDIO	4- 6 UFC
ALTO	≥7 UFC

**Figura 26.** Clasificación del nivel de contaminación según la cantidad de UFC.

### Resultados.

Los principales agentes contaminantes que afectan en los tres laboratorios de la Estación Experimental DIECA son los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* y bacterias en general. A continuación se describe la incidencia de estos contaminantes en los laboratorios durante el periodo 2018- noviembre 2019.

#### Laboratorio de *Cotesia* sp.

En la Figura 27 se representa el comportamiento del nivel de contaminación de los hongos *Penicillium*, *Aspergillus* y bacterias en el área productiva del laboratorio de *Cotesia* sp. El hongo *Penicillium* alcanzó un nivel de contaminación media durante el mes de septiembre en varias salas del laboratorio, los demás meses se mantuvo en nivel bajo o nulo. Únicamente se detectó la presencia del hongo *Aspergillus* en los meses de agosto, septiembre y octubre a un nivel de clasificación media y en pocas

áreas del laboratorio y con respecto a las bacterias, fueron las más predominantes, en los meses de septiembre y diciembre se clasificaron con niveles altos en los ingredientes de la dieta: masa y levadura, en los demás meses fueron clasificadas en niveles bajos y medios. En el área no productiva (Figura 28), el hongo *Penicillium* donde fue detectado, se clasificó en niveles bajos y medios. El hongo *Aspergillus* también mantuvo niveles de contaminación bajos y medios, únicamente se detectó nivel de contaminación alta en el mes de noviembre específicamente en el área de limpieza, pasillo del baño y pasillo corto. Con respecto a las bacterias, fueron detectadas durante todo el año en las áreas no productivas, únicamente en los meses de julio y diciembre se presentaron niveles de contaminación altos y esto en ingredientes de la dieta (masa, trigo y levadura).

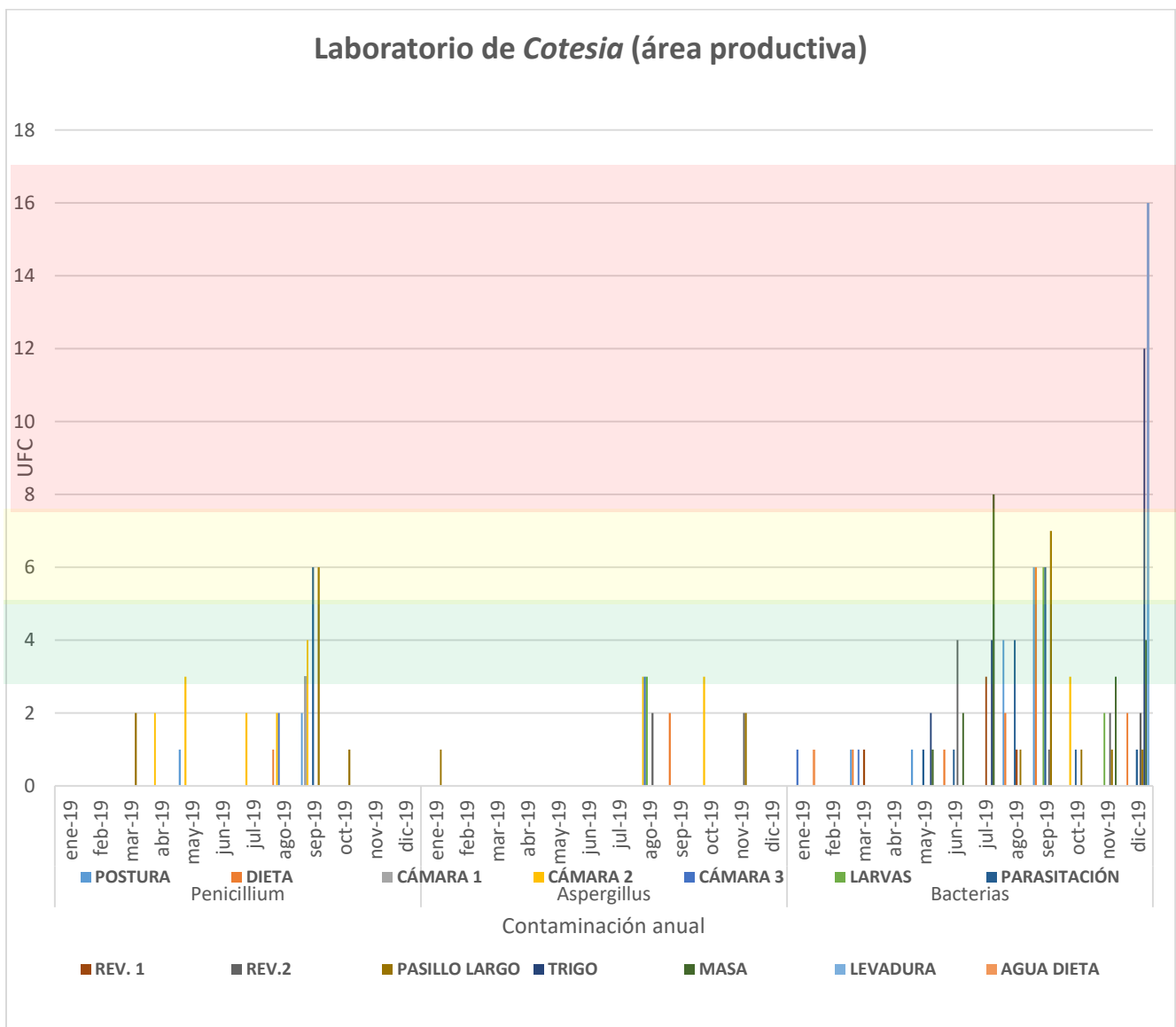
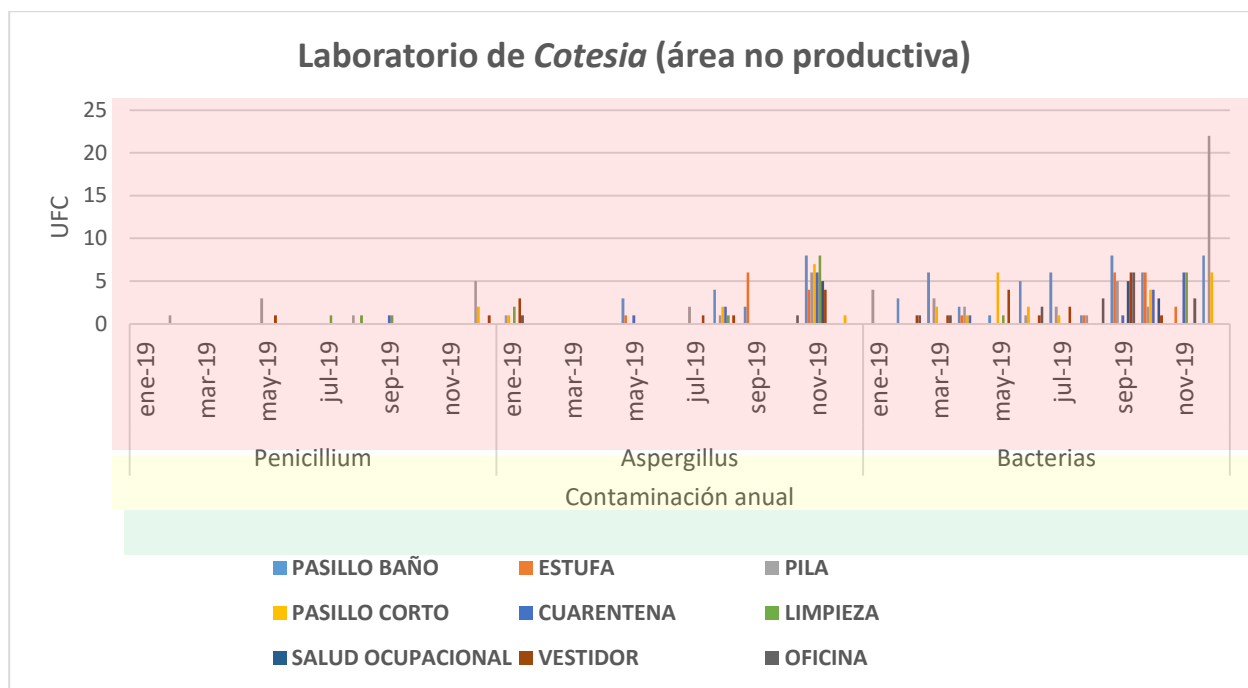


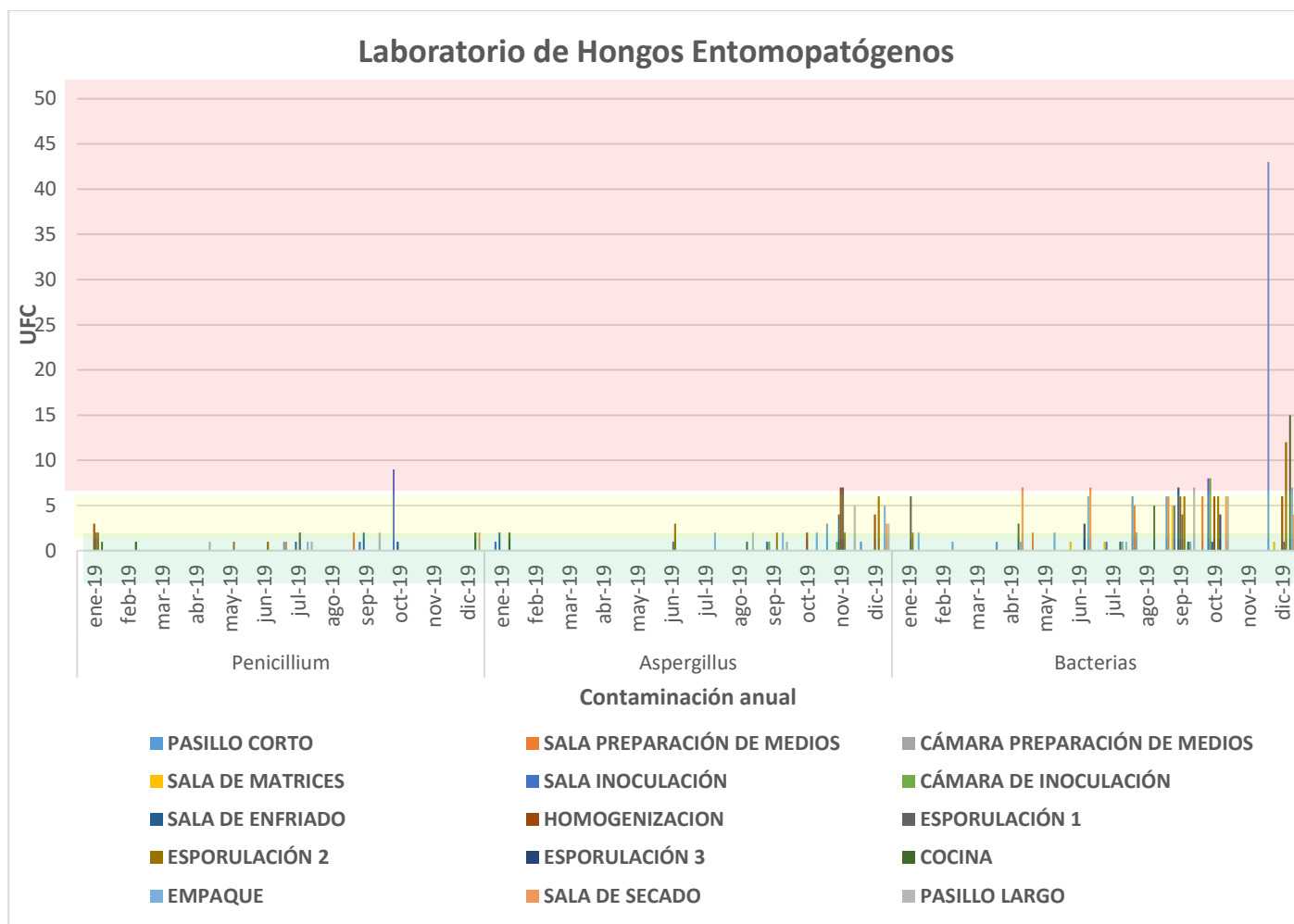
Figura 27. Nivel de contaminación del área productiva del laboratorio de *Cotesia* sp.



**Figura 28.** Nivel de contaminación del área no productiva del laboratorio de *Cotesia* sp.

### Laboratorio de Hongos entomopatógenos

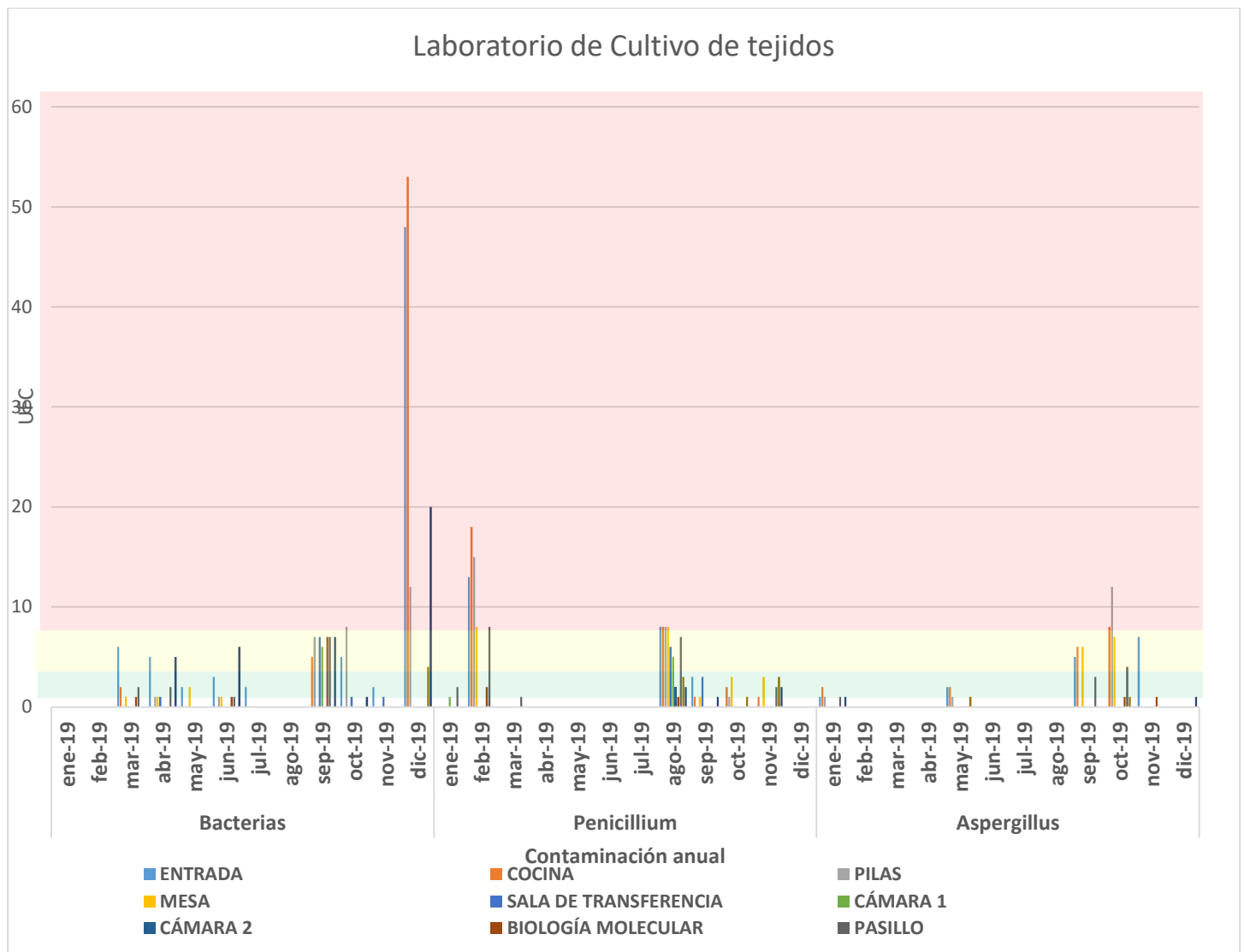
En la Figura 29 se representa el nivel de contaminación del laboratorio de hongos entomopatógenos. Se puede apreciar que el hongo *Penicillium*, presentó un nivel de contaminación entre bajo y nulo en todas las áreas muestreadas del laboratorio, a excepción de la sala de inoculación; la cuál durante el mes de octubre presentó alta contaminación. El comportamiento del hongo *Aspergillus* durante todo el año fue de niveles de contaminación entre nulos, bajos y medios y las bacterias, únicamente en el mes de diciembre reportaron niveles altos, específicamente en las siguientes áreas: pasillo corto, esporulación 2, empaque y pasillo largo.



**Figura 29.** . Nivel de contaminación del laboratorio de hongos entomopatógenos.

#### Laboratorio de Cultivo de tejidos.

En la Figura 30 se representa el nivel de contaminación de los 3 principales contaminantes del laboratorio de cultivo de tejidos durante el año. Se logra observar que el nivel de contaminación por bacterias durante el año, se clasificó entre, medio, bajo y nulo en todos los meses, a excepción del mes de diciembre, el cual presentó contaminación alta en las áreas de cocina, entrada, agitadores y pilas. El hongo *Penicillium*, presentó niveles altos de contaminación durante los meses de febrero, marzo y agosto. El hongo *Aspergillus* únicamente en el mes de octubre presentó niveles altos de contaminación, específicamente en las áreas de pilas y mesa.



**Figura 30.** Nivel de contaminación del laboratorio de cultivo de tejidos.

## 5. Conclusiones y Recomendaciones.

### 5.1 Laboratorio *Cotesia flavipes*.

La infección con microsporidios aumento respecto al año 2018 en un 4%. La determinación de la infección de estos parásitos se ha realizado mediante la implementación de técnicas moleculares que proporcionan resultados más precisos.

Debido a que la cantidad de avispas viables por vaso tiende a disminuir en los meses de mayor humedad en el ambiente, es necesario tomar medidas para lograr estabilidad en la producción, ya que la cantidad

estimada de avispas contenidas por vaso es muy importante por ser el criterio utilizado para determinar el número de vasos por hectárea necesarios y la cantidad de avispas liberadas.

La disminución en el promedio de avispas viables por vaso puede estar relacionada a una reducción en el tamaño de los puparios, los cuales a su vez pueden estar siendo afectados por alguna alteración en el desarrollo adecuado de *Diatraea* que puede atribuirse a cambios químicos o físicos en los ingredientes de la dieta.

## **5.2 Laboratorio Hongos Entomopatógenos**

El porcentaje de pérdida de matrices líquidas, disminuyó considerablemente en comparación al año 2018; esto puede atribuirse a una mejor manipulación de las mismas reduciendo así su exposición a contaminantes.

Los parámetros evaluados para determinar la calidad de los hongos presentaron valores que clasifican en promedio la producción como de calidad excelente o muy buena.

Se presentó una disminución en la cantidad de muestras de hongo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* analizados en control de calidad, lo cual se le atribuye a una reducción en la producción de estos hongos. Sin embargo, durante todo el año se mantuvo una producción suficiente para satisfacer la demanda de ambos hongos.

## **5.3 Laboratorio Cultivo de Tejidos**

El porcentaje de pérdida en invernadero pasó de un 19% en el 2018 a un 20% en el 2019. A pesar de que el aumento en la pérdida es de 1% sigue siendo preocupante un porcentaje tan alto de pérdidas de producción en invernadero, por lo que se le recomienda al personal encargado tomar las medidas al respecto.

El principal agente causante pérdida de frascos en laboratorio continúa siendo la contaminación por hongos durante el proceso productivo, seguido por la contaminación por bacterias.

Se recomienda instalar en el laboratorio de cultivo de tejidos una campana de extracción de gases, ya que el personal manipula reactivos que son peligrosos para la salud y por ende es necesario evitar su inhalación.

La trazabilidad de las plantas es muy importante, es por eso que se debe mejorar el sistema de rotulación que se utiliza para clasificar las variedades en el invernadero ya que el que se emplea actualmente al estar expuesto al agua y el sol se deteriora muy rápido.

Evitar que las plantas permanezcan en el invernadero por más de 60 días ya que su expresión genética se ve afectada al no ser incorporadas a campo en la etapa óptima de crecimiento.

#### **5.4 Asepsia de Laboratorios.**

Los desinfectantes que se emplean en los laboratorios, deben aplicarse de acuerdo a la recomendación del fabricante. Además es importante dejarlos actuar el tiempo requerido y cambiar periódicamente de producto con el fin de que no se desarrolle resistencia por parte de los microorganismos.

En el laboratorio de cultivo de tejidos es necesaria la implementación del uso de pediluvios en las puertas, esto como medida reductora del ingreso de contaminantes en el laboratorio.

Ya que la carga fúngica en el ambiente aumenta en proporción a la humedad es necesario aplicar medidas especiales en las épocas de mayor humedad para mantener la temperatura dentro del rango óptimo y así evitar incrementos de contaminantes.