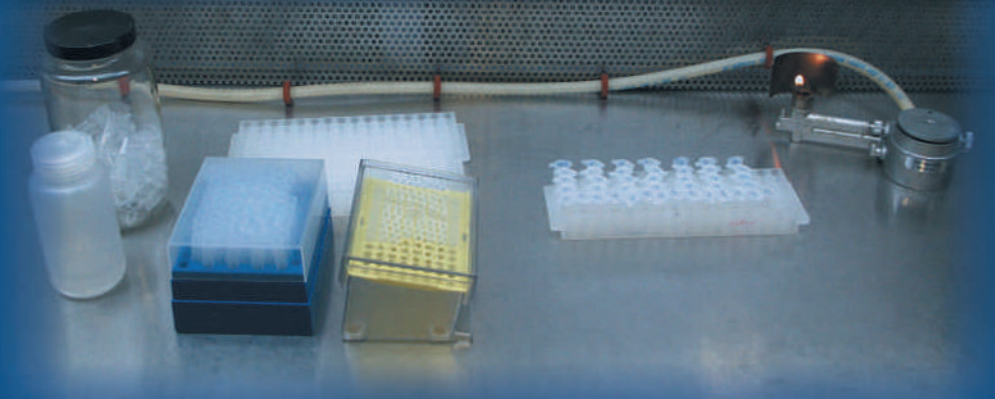
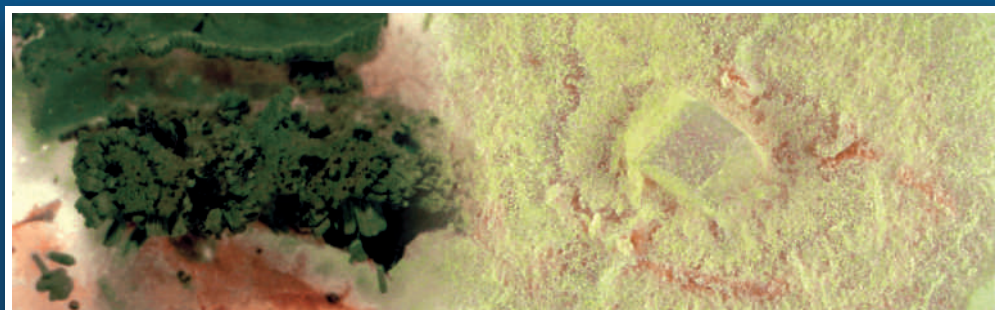


MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS



VERÓNICA CAÑEDO

TERESA AMES

MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS



**VERÓNICA CAÑEDO
TERESA AMES**

Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú;
Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.

© Centro Internacional de la Papa (CIP), 2004

Las publicaciones del CIP contribuyen con información importante sobre el desarrollo para el dominio público. Los lectores están autorizados a citar o reproducir este material en sus propias publicaciones. Se solicita respetar los derechos de autor del CIP y enviar una copia de la publicación donde se realizó la cita o publicó el material al Departamento de Comunicación y Difusión, a la dirección que se indica abajo.

Centro Internacional de la Papa
Apartado 1558
Lima 12, Perú

cip@cgiar.org
www.cipotato.org

Edición: Cañedo V., Ames T. 2004.

Fotografía: Verónica Cañedo

Diseño y Diagramación: Milton Hidalgo, Departamento de Comunicación y Difusión

Coordinación: Cecilia Lafosse, Departamento de Comunicación y Difusión

ISBN 92-9060-238-4

Tiraje: 1000 ejemplares

Impreso en el Perú

Octubre del 2004

CONTENIDO

Presentación	1
Introducción	3
Generalidades de los hongos entomopatógenos	5
■ Clasificación de los hongos entomopatógenos	7
■ Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos	10
Asepsia	14
■ Desinfección del ambiente (Laboratorio y almacenamiento)	16
Medios de cultivo de laboratorio	18
■ Agar agua	19
■ Papa dextrosa agar (PDA)	20
■ Fitolevadura	21
■ Sabouraud	21
■ Miel peptona agar	22
Colección y aislamiento de hongos entomopatógenos	24
Cultivos monospóricos	29
■ Aislamiento de punta de hifa	31

Caracterización morfológica	33
■ Descripción de la colonia	33
■ Descripción del hongo	34
■ Características morfológicas más importantes de los hongos entomopatógenos más comunes	35
Conteo de conidias en el hematocímetro o cámara de Neubauer	40
Caracterización fisiológica	43
■ Número de conidias	43
■ Viabilidad de conidias	43
Conservación de hongos	45
■ Conservación en sílica gel	46
■ Conservación de hongos por liofilización	47
Multiplicación de hongos entomopatógenos sobre diferentes sustratos naturales	50
Bioensayos	52
Glosario	55
Literatura consultada	60

PRESENTACIÓN

En los primeros años del Siglo XXI, las proyecciones sobre el incremento poblacional indican que en las décadas venideras habrá necesidad de producir más y mejores alimentos para satisfacer la demanda mundial. Sin embargo, este reto es amenazado por las plagas, que representan un serio problema para los agricultores, reduciendo su rentabilidad y competitividad. Por otro lado, actualmente existe evidencia de que un uso irracional de plaguicidas para controlar las plagas puede generar serios problemas relacionados con el medio ambiente o la salud de las personas. Por esta razón, instituciones como el Centro Internacional de la Papa (CIP), realizan trabajos de investigación para encontrar métodos alternativos para el control de plagas. Entre estos métodos innovadores se incluye el uso de enemigos naturales, como los hongos entomopatógenos, una de cuyas ventajas es reducir el riesgo de causar efectos negativos en el ambiente o en las personas. Sin embargo, hay aún mucho trabajo por hacer para tener bioplaguicidas eficientes basados en hongos, siendo el primer paso la colección, aislamiento, caracterización y multiplicación de estos microorganismos. Esta etapa de la investigación debe realizarse correctamente, para establecer bases sólidas para el futuro desarrollo de bioplaguicidas, ya que se requiere conocer muy bien al agente

entomopatógeno para poder multiplicarlo y evaluarlo como potencial control biológico. El manual de laboratorio que se presenta en este documento representa el esfuerzo de los investigadores del CIP para realizar un trabajo científico y técnico sobre el uso de hongos. El documento incluye temas sobre los medios de cultivo en laboratorio, la colección y el aislamiento, el cultivo y caracterización, la conservación, la multiplicación y los principios para realizar bioensayos con estos microorganismos. El objetivo de este manual es presentar diversas metodologías que puedan ser útiles para muchas instituciones, especialmente de investigación y educación, actualmente interesadas en los hongos entomopatógenos como métodos de control de plagas.

Oscar Ortiz,

Líder de División de Manejo Integrado de Cultivos, Centro Internacional de la Papa (CIP).

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los insectos que atacan a las plantas cultivadas tienen enemigos naturales que los parasitan y matan, produciendo así una reducción considerable en su población. El uso de hongos entomopatógenos para la exterminación de tales insectos constituye, por lo tanto, un componente importante de control, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan para este propósito.

En el cultivo de la papa, tanto la planta como los tubérculos son infestados por diversos insectos que destruyen la planta, durante su permanencia en el campo, y el tubérculo, una vez cosechado. A su vez, hongos como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* y *Paecilomyces* spp., son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospedantes y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares. En el Perú se ha trabajado en programas para el control del gorgojo de los Andes principalmente. También se han controlado nematodos utilizando *Paecilomyces lilacinus*.

Dada la importancia que determinados hongos tienen en nuestro medio para el control de insectos que atacan al cultivo de papa, se ha preparado

el presente manual, para que sirva de guía en los trabajos de investigación y propagación de hongos con fines de control.

Las indicaciones que se dan están al alcance incluso de laboratorios no muy bien equipados, pues los métodos descritos se pueden llevar a cabo en condiciones austeras. Los lineamientos generales que se dan aquí para la preparación del sustrato para la propagación de los hongos, tan importante para la inoculación en el campo y en el almacén, pueden ser modificados de acuerdo a las condiciones de cada lugar y a los insumos con que se cuente.

GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos son las plagas agrícolas. El uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, la resurgencia de nuevas plagas y la contaminación ambiental y del hombre. Estos factores han hecho posible el surgimiento de sistemas nuevos de producción agrícola, como la producción orgánica; han creado la necesidad de obtener productos inofensivos para otros organismos no perjudiciales (entomófagos) y han obligado a legislar más estrictamente sobre la presencia de residuos en los productos agropecuarios.

El manejo integrado de plagas (MIP), que se basa en principios totalmente ecológicos, considera todo el agroecosistema en su conjunto. Como tal, comprende la aplicación armónica de diferentes métodos de control, como la lucha biológica y las prácticas culturales que requiere el cultivo, teniendo en cuenta los niveles poblacionales de las plagas y enfermedades a controlar, la presencia de los biorreguladores naturales, las etapas fenológicas del cultivo y las condiciones ambientales presentes.

Uno de los componentes del MIP es el control biológico de las plagas agrícolas mediante parasitoides, predadores (entomófagos) y organismos entomopatógenos que pueden ser hongos, bacterias, virus, nematodos y

protozoarios. Los hongos entomopatógenos son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies y amplio rango de hospedantes así como por su crecimiento microscópico sobre la superficie de su huésped. Todos los insectos son susceptibles de ser afectados por algún hongo.

Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprofita puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo miceliano. Esta característica permite que el hongo pueda ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo. Los hongos tienen un gran potencial para ser empleados como biocontroladores. Entre los principales hongos que presentan estas características están: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*.

Las principales ventajas de estos hongos son:

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de las cepas, pueden ser específicas a nivel de especie, sin afectar a los enemigos naturales.
2. Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
3. Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.

5. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto.

Pero también presentan algunas desventajas, como:

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).
2. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
3. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

Clasificación de los hongos entomopatógenos

De acuerdo a la clasificación realizada por Ainsworth (1973), los hongos son separados en dos divisiones: Myxomycota, aquellos que forman plasmodios, y Eumycota, aquellos que no forman plasmodios y son frecuentemente micelianos. Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota dentro de cinco subdivisiones: Mastigomycotina (forman zoosporas, oosporas y presentan estado perfecto), Zygomycotina (no presentan zoosporas, presentan estado perfecto y forman zygosporas), Ascomycotina (presentan estado perfecto y forman ascosporas), Basidiomycotina (presentan estado perfecto forman basidiosporas) y Deuteromycotina (no presentan estado perfecto ni zoosporas y forman conidias). Las clases de mayor importancia desde el punto de vista del

control de plagas agrícolas son Zygomycetes e Hyphomycetes (Tanada y Kaya, 1993).

Muchos hongos entomopatógenos se encuentran en la subdivisión Zygomycotina, clase Zygomycetes, orden Entomophthorales; en Ascomycotina, clase Pyrenomycetes, orden Sphaerales; clase Laboulbeniomyces, orden Laboulbeniales y en Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Moniliales (Tabla 1).

Tabla 1: Principales hongos entomopatógenos (Tanada y Kaya, 1993)

Subdivisión	Clase	Orden	Género
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coelomycidium</i> <i>Myiophagus</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomyces</i>
	Oomycetes	Lagenidiales	<i>Lagenidium</i>
	Oomycetes	Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
		Entomophthorales	<i>Conidiobolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrum</i> <i>Neozygites</i>
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastodendrion</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Mycoderma</i> <i>Saccharomyces</i>
	Plectomycetes	Ascosphaerales	<i>Ascosphaera</i>
	Pyrenomycetes	Sphaerales	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i>

			<i>Nectria</i>
			<i>Hypocrella</i>
			<i>Calonectria</i>
			<i>Filariomyces</i>
	Laboulbeniomyces	Laboulbeniales	<i>Hesperomyces</i>
			<i>Trenomycetes</i>
	Loculoascomycetes	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
	Loculoascomycetes	Pleosporales	<i>Podonectria</i>
Deuteromycotina	Hyphomycetes		<i>Akanthomyces</i>
			<i>Aschersonia</i>
			<i>Aspergillus</i>
			<i>Beauveria</i>
			<i>Culicinomyces</i>
			<i>Engyodontium</i>
			<i>Fusarium</i>
			<i>Gibellula</i>
			<i>Hirsutella</i>
			<i>Hymenostilbe</i>
			<i>Metarhizium</i>
			<i>Nomuraea</i>
			<i>Paecilomyces</i>
			<i>Paraisaria</i>
			<i>Pleurodesmospora</i>
			<i>Polycephalomyces</i>
			<i>Pseudogibellula</i>
			<i>Sorospora</i>
			<i>Sporothrix</i>
			<i>Stilbella</i>
			<i>Tetranacrium</i>
			<i>Tilachlidium</i>
			<i>Tolypocladium</i>
			<i>Verticillium</i>
Mycelia sterilia			<i>Aegerita</i>
Basidiomycotina	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i>
			<i>Septobasidium</i>
			<i>Uredinella</i>

Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

La enfermedad producida por hongos se llama micosis. Tanada y Kaya (1993) mencionan que el desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases (Figura 1):

- 1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto:** El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse dan origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. La espora que germina en el insecto forma un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Samson, *et al*, 1988).

Los hongos, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas. Las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, pueden destruir a la hifa germinativa. En este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas.

- 2. Penetración dentro del hemocele:** Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de



Figura 1 : Mecanismo de infección de hongos entomopatógenos (Hyphomycetes).

sustancias nutricionales y antifungosas (Charnley, 1984) y estado de desarrollo del insecto. La digestión del integumento se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterasas y quitinasas). Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso, el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto.

- 3. Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto:** Luego de que llegue al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (Pérez, 2004) y produciendo micotoxinas (Tanada y Kaya, 1993). La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo.

Las toxinas producidas juegan un rol muy importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. La muerte del insecto se produce con mayor rapidez cuando es afectado por un hongo entomopatógeno que produce cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales.

A continuación del crecimiento del hongo en el hemocele, se producen los síntomas fisiológicos del insecto afectado como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados (deja de alimentarse, reduce su movimiento), entra en un estado letárgico y finalmente muere, lo que puede ocurrir relativamente rápido o en unos cuantos días. Ocurre una competencia entre el

hongo y la flora intestinal. Los hongos pueden producir sustancias antibacterianas que alteran la coloración del cadáver (Ferrón, 1978). Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica: el hongo crece en el hemocele formando masas micelianas que salen al exterior fundamentalmente por las regiones intersegmentales –esporulando sobre el cadáver y produciendo inóculo para infectar a otros insectos– y por las aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). La gran dependencia de la humedad es el mayor factor limitante que presentan los hongos, ya que para que se produzca la germinación y esporulación fuera del hospedante se requieren valores de humedad relativa superiores a 90%.

ASEPSIA

Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar el trabajo.

Lavado

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

Esterilización

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades cuando se

ejecuta en forma eficiente. La forma más común de esterilización es por medio del calor seco o húmedo.

La esterilización por calor seco se consigue con el uso de un horno o estufa y es útil en el caso de esterilizar placas petri y otros materiales de vidrio. La temperatura a la que se somete el material durante 90 a 120 minutos debe fluctuar entre 160 y 180 °C. Es eficaz, siempre y cuando se deje espacio libre para que el aire caliente circule alrededor de los materiales.

La esterilización por calor húmedo o a presión de vapor de agua se consigue con el uso de una autoclave (Figura 2). Se encuentran de varios modelos y tamaños, pero todas tienen el mismo principio de funcionamiento. A mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua; cuando la presión aumenta a 15 libras (dos atmósferas), la temperatura llega a 121.6 °C. No existe microorganismo que tolere esta temperatura durante 15 minutos. El tiempo es el factor que permite que el calor penetre en la masa de

esterilización y se absorba. Cuando se esterilizan medios de cultivo en frascos de vidrio, se debe asegurar que éstos ocupen no más de las tres cuartas partes del frasco para permitir una ligera ebullición sin derramarse, por lo mismo, las tapas deben colocarse ligeramente sueltas. Los frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón para permitir la circulación del vapor. Los tubos de ensayo conteniendo medio, se deben colocar en una gradilla o rejilla.



Figura 2: Autoclave.



Figura 3: Cámara de flujo laminar con luz ultravioleta.

El uso de los rayos de luz ultravioleta (U.V.) es eficaz para eliminar organismos que se encuentran sobre superficies, ya que este tipo de luz tiene poca penetración (Figura 3).

DESINFECCIÓN DEL AMBIENTE (LABORATORIO Y ALMACENAMIENTO)

Como ya se ha dicho, cuando se trabaja con hongos entomopatógenos es necesario tener los ambientes de trabajo así como los utensilios, materiales de vidrio, etc. en completo estado de asepsia. Existe un conjunto de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación por microorganismos ya sean hongos entomopatógenos, fitopatógenos, patógenos del hombre, saprofitos, etc. que puedan interferir con el trabajo que se desea realizar. Éstos pueden estar flotando en el aire, depositados sobre las superficies de trabajo y del ambiente como paredes, techos, estantes, entre otros.

El alcohol es muy utilizado en trabajos de laboratorio para desinfectar la superficie de la cámara de flujo laminar así como las superficies de trabajo. Los alcoholes actúan desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes.

Para reducir la contaminación en el ambiente de trabajo, se pueden realizar aplicaciones de sustancias antisépticas como el Timol.

Preparación:

- ***Preparar una solución de 1 gramo de Timol en 1 litro de agua***

Esta solución se asperja sobre muebles, paredes, etc. y todo aquello que forma parte del interior del laboratorio.

Precauciones al aplicar:

- Evitar que caiga sobre la piel y los ojos, de ser así lavar bien con agua corriente.
- Evitar inhalarlo.
- Luego de aplicar, dejar la habitación totalmente cerrada.
- No aplicar sobre alimentos.
- Aplicar sobre toda superficie del laboratorio: paredes, muebles, pisos, zócalos, etc.
- El operador debe estar provisto de máscara, guantes y toda protección posible.

La operación de aplicación no debe durar más de 10 minutos.

MEDIOS DE CULTIVO DE LABORATORIO

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras.

Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80 °C

y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 y 50 °C.

Los medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado. Los medios se seleccionan en base al tipo de muestra que queremos reproducir.

El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8).

Para seguridad del que opera y evitar contaminaciones, los medios de cultivo se deben manipular en campanas de flujo laminar (Figura 4). A continuación se describen los medios de cultivo mayormente utilizados y su composición.

AGAR AGUA

Es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy rala. Es especialmente usado para hacer aislamientos de punta de hifa. De acuerdo a la consistencia que se quiera dar al medio, se puede hacer con mayor o menor cantidad de agar.

Agar	10 g
Agua destilada	1 litro



Figura 4: Placas petri conteniendo medio de cultivo en la cámara de flujo laminar.

PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium (Verticillium)* y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. Cuando se aíslan hongos a partir de insectos colectados del suelo, es recomendable acidificar el medio con ácido láctico al 25%. Se agregan 3 ó 4 gotas sobre el agar solidificado de la placa con el objeto de evitar el desarrollo de bacterias.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

Papa sin pelar	200 g
Dextrosa	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1 litro

Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, colar y disolver en el líquido la dextrosa y el agar. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

FITOLEVADURA

Este medio se usa para aislar hongos a partir de animales. Los hongos aislados de insectos crecen exuberantemente con micelio bien algodonoso y buena producción de esporas.

Dextrosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Agar	18 g
Agua destilada	1 litro

SABOURAUD

Es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación.

Dextrosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

MIEL PEPTONA AGAR

Este medio se recomienda porque tiene un pH que inhibe el desarrollo de algunas bacterias

Miel de caña	60 g
Peptona	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

Se pueden utilizar antibióticos como Penicilina + Estreptomina (30 – 50 ppm) que deben agregarse a los medios de cultivo después de ser esterilizados en autoclave y enfriarlos a una temperatura menor a 60 °C.

Existen, además, los llamados medios completos, los cuales varían de acuerdo a los requerimientos del trabajo.

Los medios líquidos son aquellos a los que no se incorpora la sustancia solidificante, pudiendo tener la misma composición que los medios sólidos. Son utilizados para obtener una producción masiva con fines de inoculación en sustratos de propagación. Los medios líquidos generalmente se colocan en un agitador continuo durante tres o más días de acuerdo a la especie que se está propagando. Cuando se trata de *Beauveria* en medio líquido las estructuras propagativas toman la forma de las levaduras.

Para evitar la contaminación con bacterias, es recomendable acidificar el medio contenido en la placa con unas gotas de ácido láctico distribuidas uniformemente en la superficie del medio de cultivo.

SIEMBRA

La siembra se realiza con el fin de aislar o repicar los hongos para su uso inmediato o para mantenerlos viables por un tiempo corto. La siembra o

aislamiento en cultivo puro consiste en dejar crecer el hongo elegido bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente. Para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo –si fuera necesario– y colocar una pizca del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un ansa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo. Generalmente para la siembra se usan placas, tubos y frascos. Después de la siembra se sellan las placas, tubos y frascos, se coloca la fecha y se incuba durante el tiempo conveniente hasta que se vea que el hongo ha crecido y está esporulando (Figura 5).



Figura 5: Aislamiento de hongos en placa y tubos inclinados conteniendo medio de cultivo.

COLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

En condiciones naturales, algunas plagas tienen sus controladores biológicos específicos que se encuentran presentes en el aire o en el suelo y se concentran en las proximidades de las plantas afectadas. Entre los controladores de insectos están los hongos entomopatógenos. Para el aislamiento de estos hongos, las muestras se colectan en el hábitat natural del insecto.

Colectar consiste en recoger insectos vivos o muertos, en el follaje, axilas, tallos, corteza de los árboles, sobre la superficie o en el interior de éstos, en el suelo, inclusive en crianzas masivas de laboratorio. Si el insecto se encuentra pegado a una superficie, es necesario cortar la porción del sustrato que lo contiene y colocarlo en una placa o frasco, pero nunca en sobre de papel o en medio líquido. El material se conserva mejor si se mantiene a bajas temperaturas.

Se deben colectar insectos en diferentes estados de desarrollo que presenten signos iniciales o avanzados de estar parasitados (Figura 6).



Figura 6: Insectos colectados en campo con síntomas de ataque de hongos.

Los insectos colectados deben ir con los datos respectivos de:

1. Nombre del colector.
2. Nombre del insecto colectado (familia, género, especie).
3. Lugar (en este caso no es suficiente poner el nombre del área, hay que incluir el lugar preciso).
4. Hospedante, cultivo o ambiente.
5. Altitud.
6. Fecha.
7. Observaciones adicionales (estado del insecto, signo, síntomas, condiciones climáticas, etc.).



Figura 7: A) materiales utilizados para el montaje de cámara húmeda;
B) muestras colocadas en cámara húmeda.



Figura 8: Crecimiento del hongo en cámara húmeda, A) vista general y B) crecimiento del hongo sobre el insecto.

Una vez en el laboratorio, las muestras son procesadas como sigue (Figura 7):

1. Remojar el insecto en hipoclorito de sodio (0.5% del producto activo) durante 5 minutos.
2. Enjuagar tres a cuatro veces con agua destilada estéril.
3. Colocar papel de filtro estéril en una caja Petri esterilizada y agregar agua destilada estéril.
4. Colocar el insecto sobre el papel de filtro dentro de la caja.
5. Sellar la placa con parafilm®.
6. Incubar a 20 °C durante 7 días (Figura 8).
7. Con una aguja de siembra, en la cámara de flujo laminar, tocar levemente el cuerpo del insecto donde se vea crecimiento fungoso y transferir su contenido a medio de cultivo (Figura 9).



Figura 9: Desarrollo del hongo en medio de cultivo luego del aislamiento a partir de cámara húmeda.

CULTIVOS MONOSPÓRICOS

Para establecer una colección confiable, es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se consigan. Los aislamientos monospóricos pueden ser por colonia o por punta de hifa (Figura 10).

El procedimiento es como sigue:

1. Sembrar el hongo que se ha aislado directamente del insecto, en un tubo inclinado con medio de cultivo e incubarlo a 20 °C durante 5 días.
2. Preparar una solución de Tween 80 al 0.1% como sigue:
 - De la formulación comercial, hacer una dilución al 10%. Tomar 10 ml de Tween 80 y agregar 90 ml de agua destilada. Esta solución se puede mantener en stock en refrigeración (10°C).
 - Para la preparación del Tween al 0.1%, tomar 1 ml de la solución al 10% y agregar 99 ml de agua destilada. Esta solución se esteriliza en el autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.
3. Preparar una suspensión de esporas, a partir del tubo con el hongo en desarrollo.

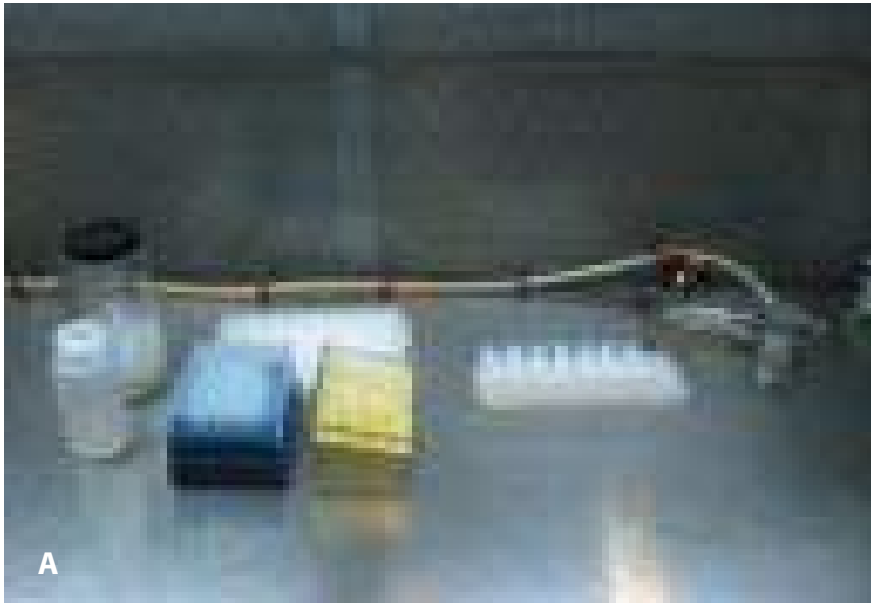


Figura 10: Procesamiento de cultivos monospóricos, A) materiales utilizados y B) crecimiento de algunas conidias por placa.

4. En un eppendorf con 1 ml de la solución de Tween al 0.1% colocar una pequeña porción del hongo y agitar ligeramente para que se separen todas las esporas.
5. Agitar en un vortex por espacio de 15 segundos y colocar en bañomaría de ultrasonido durante 3 minutos.
6. Cargar un hematocímetro o cámara de Neubauer y contar el número de esporas bajo el microscopio de visión plana.
7. Para realizar una segunda dilución, tomar 100 µl de la suspensión anterior y agregar 900 µl de agua destilada, agitar en el vortex.
8. Hacer las diluciones que sean necesarias para tener una suspensión a una concentración de 50 a 100 esporas por mililitro.
9. Sembrar 100 µl de la concentración deseada en una placa con medio PDA y distribuirla con una espátula de Drigalski, dentro de la cámara de flujo laminar.
10. Incubar a 20 °C por espacio de una semana.
11. Cortar con una hoja de bisturí estéril una colonia en formación y transferirla a otra placa con PDA.
La idea es que la colonia a cortarse provenga de una sola conidia (Figura 11).

AISLAMIENTO DE PUNTA DE HIFA*

Es otro método de producir un cultivo puro proveniente de una sola conidia. Para ello se sigue la siguiente secuencia:

1. Preparar una dilución de conidias de 2500/ml con Tween 80 al 1% estéril.
2. Poner en un vaso de precipitación una cantidad conveniente de agar agua caliente (40°C).

* Este método es muy tedioso de ejecutar y tiene el inconveniente de que se contamina con facilidad



Figura 11: Desarrollo de una colonia proveniente de una conidia.

3. Sumergir el extremo de una lámina portaobjetos en el vaso y sacarlo.
4. Limpiar la superficie inferior de la lámina y colocarla en una placa Petri. La placa debe tener un papel de filtro estéril en el fondo, humedecido con agua destilada estéril. Es recomendable poner la lámina sobre una varilla de vidrio en forma de V también estéril dentro de la placa.
5. Sembrar el hongo con una ansa en la porción de la lámina que tiene la película del medio y estirla cuidadosamente.
6. Incubar por dos - tres días.
7. Observar en cámara de flujo laminar al microscopio las colonias que se han formado.
8. Escoger la colonia que esté más aislada.
9. Buscar al microscopio la punta de una hifa solitaria y cortarla.
10. Poner la punta cortada en placa Petri conteniendo PDA o Fitoagar.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

El primer paso en el estudio de los hongos entomopatógenos es realizar una correcta identificación de la especie con la que se está trabajando. Existen varias claves de identificación de hongos, una de ellas es "*CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria*" perteneciente a la Commonwealth Micological Institute, donde se encuentran descritas las especies de hongos entomopatógenos.

Esta caracterización se basa en la descripción de la colonia (macroscópica) así como de las estructuras del hongo (microscópica).

Descripción de la colonia

1. Con un ansa de siembra, tocar ligeramente el hongo a propagar y sembrar por punción en ángulo recto en el centro de la placa conteniendo el medio de cultivo PDA.
2. Incubar a 20°C durante 15 días.
3. Observar la forma de crecimiento de la colonia, tamaño (el cual se mide de lado a lado pasando por el centro en dos puntos de la colonia), aspecto, textura y coloración de ambas caras y la producción de pigmentos (Figura 12).

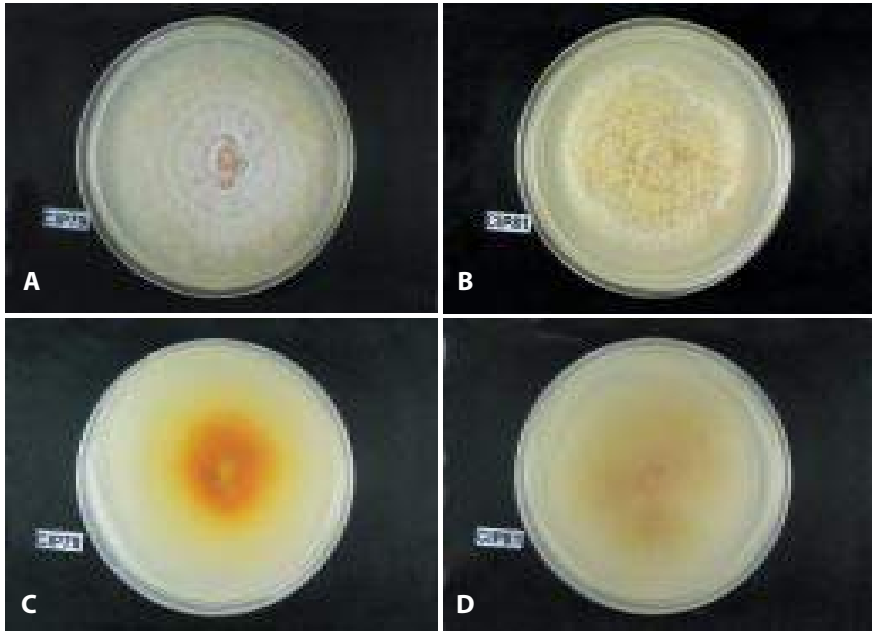


Figura 12: Aspecto y coloración del crecimiento de hongos por ambas caras de la placa. A y B, haz de la placa; C y D, envés de la placa. A y C, CIP79 *Paecilomyces fumosoroseus*. B y D, CIP81 *Beauveria bassiana*.

Descripción del hongo

Para la descripción del hongo mediante una observación microscópica de sus estructuras, es necesario realizar una tinción o coloración, siendo el procedimiento el siguiente:

1. Sembrar el hongo en una placa con medio de cultivo PDA.
2. Esperar el crecimiento por espacio de 15 días.
3. En una lámina portaobjetos, colocar una gota de azul de lactofenol u otra solución.

Azul de lactofenol (azul de algodón)

Ácido láctico	25 ml
Glicerina	50 ml
Agua destilada	25 ml
Azul de algodón	0.05 g

4. Con una aguja entomológica No. 000 ó con un alfiler minutum, tomar una pequeña muestra del tejido hifal y dispersarla en un portaobjetos sobre una gota del colorante y colocarle un cubreobjeto.
5. También se puede tocar levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre una lámina portaobjetos.
6. Observar al microscopio plano con aceite de inmersión, cuando las estructuras son muy pequeñas.
7. Medir la longitud y el diámetro de cualquier estructura de interés de acuerdo a la especie que se está observando.

Este método permite ver las estructuras sin que pierda su disposición natural y sin perturbar mucho su morfología.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MÁS IMPORTANTES DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS MÁS COMUNES

***Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin**

Colonia: la colonia en PDA a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca. A medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta, cremosa. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor.

Conidióforos: de 1-2 μ de diámetro donde nacen células conidiógenas en grupos grandes.

Células conidiógenas (c.cs.): están agrupadas formando grupos compactos grandes y a veces solitarias, en forma de botellitas de 3 a 6 x 3 a 5 μ . En ciertos casos, las c.cs. se ramifican formando c.cs secundarias. Al final de las c.cs se forma un raquis que sostiene las conidias.

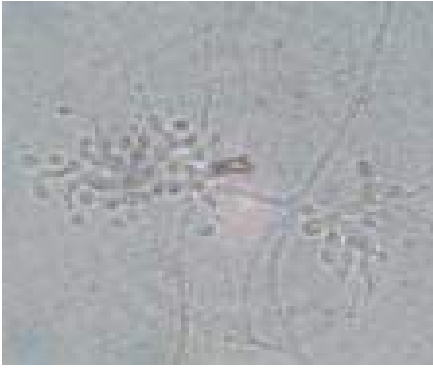


Figura 13: *Beauveria bassiana*
(Bálsamo) Vuillemin.

Raquis: hasta de 20 μ de longitud y 1 μ de diámetro, denticulado, que sostiene una conidia en cada dentícula.

Conidias: hialinas, globosas a sub-globosas, de 2 a 3 x 2 a 2.3 μ . que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Figura 13).



Figura 14: *Beauveria brongniartii*
(Saccardo) Petch.

***B. brongniartii* (Saccardo) Petch**

Colonia: algodonosa a polvorienta, muy parecida a la de *B. bassiana* incluso en el color del revés, aunque a veces adquieren un tinte rosado.

Células conidiógenas: solitarias o en grupos de unas pocas. Tienen forma de botellita sub-globosa o alargada de 4 a 18 μ en la base x 1.5 a 4 μ en el ápice.

Raquis: denticulado y puede llegar hasta 25 μ de largo.

Conidias: elipsoides de 2 a 4 x 1.5 a 3 μ (Figura 14).

Otras especies: *B. amorpha*

***Paecilomyces farinosus* (Holm ex S.F. Grey) Brown & Smith**

Colonia: en sus inicios y en PDA, la colonia es blanca, pegada al medio, pero

luego se pone amarillenta y algodonosa. Revés inicialmente blanco, cambia al amarillo y finalmente se vuelve anaranjado.

Conidióforo: largo hasta 300 μ de longitud x 1 a 2 μ de diámetro, septado. Los conidióforos sostienen a los fiálides.

Fiálides (células conidiógenas): son estructuras en cuyo interior se forman las conidias. Se insertan en el ápice de los conidióforos en grupos de dos a cinco, tienen forma abultada en la base de 5 a 10 μ y va adelgazando en el ápice de 1 a 1.5 μ , tienen forma de botella.

Conidias: hialinas, elípticas o en forma de limón. Se presentan en cadenas cortas. Miden de 2 a 4 μ de longitud x 1.5 a 2.5 μ de diámetro.

***Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith**

Colonia : en PDA inicialmente blanca, luego adquiere un tinte rosado muy tenue. El revés de la colonia es al comienzo ligeramente amarillento, pero a medida que pasa el tiempo se vuelve de color anaranjado intenso.

Conidióforos: generalmente terminales pero también se forman en cualquier parte del micelio. Alcanzan hasta 100 μ de largo x 1.5 a 3 μ de diámetro.

Fiálides: muy semejantes a los de *P. farinosus*, sólo que están en grupos compactos de tres a seis. También tienen forma de botella con la base ancha que se va adelgazando. Miden de 5 a 7 μ de largo x 2.5 a 3 μ de diámetro, que se reduce a 0.5 μ en el extremo superior.

Conidia: cilíndrica a fusiforme de extremos redondeados, miden de 3 a 5 x 1 a 2 μ , se observan en cadenas largas (Figura 15).

Otras especies: *P. javanicus*, *P. tenuipes*, *P. lilacinus*



Figura 15: *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith.



Figura 16: *Lecanicillium lecanii* (Zimerman) Gams & Zare [= *Verticillium lecanii* (Zmm) Viégas].

***Lecanicillium lecanii* (Zimerman) Gams & Zare [= *Verticillium lecanii* (Zmm) Viégas].**

Colonia: en PDA blanco amarillenta compacta y revés amarillo intenso. A los 10 días alcanza un diámetro de 15 a 25 mm, la colonia es generalmente simétrica.

Conidióforo: no se diferencia mucho de la hifas somáticas, pero de trecho en trecho sostiene a los fiálides.

Fiálides (células conidiógenas): erectos, anchos en la base y terminan en una punta delgada por donde salen las conidias. Generalmente en grupos de dos a seis, aunque también hay algunos solitarios. Miden de 11 a 30 μ de largo x 1.5 a 2 μ de diámetro, son

ligeramente anchos en la base y van adelgazando hacia la punta.

Conidias: salen del extremo de los fiálides en grupos formando cabezuelas. Son elipsoidales de 2 a 4 x 1 a 1.5 μ . Son uniformes en cuanto a forma y tamaño dependiendo del aislamiento (Figura 16).

Otras especies: *L. muscarium* y *L. longisporum*

Metarhizium anisopliae
(Metschnikoff) Sorokin

Colonia: pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento. Revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino.

Conidióforo: nace del micelio y es irregularmente ramificado con dos a tres ramas en cada septa. De 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 de diámetro.

Fiálides: cilíndricos en forma de clava, adelgazados en el ápice. Miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro.

Conidias: unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo. Miden 3.5 a 9 μ de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Figura 17).

Otras especies: *M. flavoviridae*

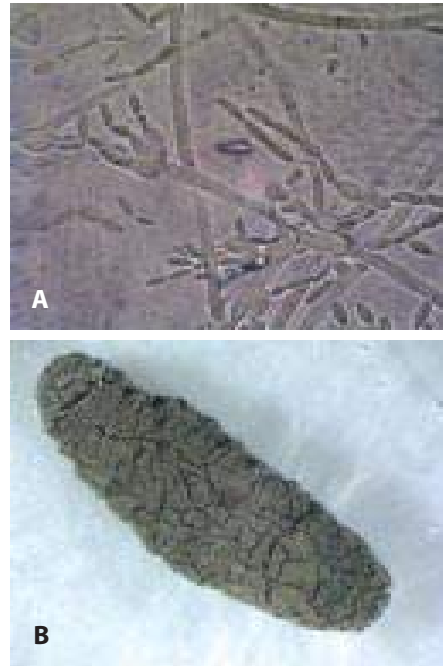


Figura 17: A) *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. B) Insecto atacado por *M. anisopliae*.

CONTEO DE CONIDIAS EN EL HEMATOCÍMETRO O CÁMARA DE NEUBAUER

Para determinar el número de conidias por volumen contenidas en una determinada suspensión, se utiliza un hematocímetro o cámara de Neubauer.

El hematocímetro es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm² cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de las conidias. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.

Procedimiento

1. Preparar una suspensión de conidias en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidias y cubrirla con el cubreobjeto.
3. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40x es un aumento adecuado) (Figura 18).
4. Contar las conidias presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se deben contar las conidias que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la



Figura 18: Cámara de Neubauer vista al microscopio (40X).

parte superior y la derecha del cuadrado. Se cuentan en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara [cinco arriba y cinco abajo]) (Figura 19).

5. Determinar el número de conidias por ml y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula:

Conidias / ml = # de conidias contadas x 25,000 x factor de dilución

Conidias total = conidias / ml x Vol. de la suspensión original de conidias.



Figura 19: Sector de la cámara de Neubauer que se debe contar.

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Esta caracterización se basa en la evaluación de rendimiento en número de conidias y viabilidad de las mismas (porcentaje de germinación).

Número de conidias

1. Sembrar 10 μ l de una suspensión de conidias con una concentración de 10^6 conidias/ml en medio PDA y distribuirla uniformemente en la placa con la ayuda de una espátula de Drigalski.
2. Incubar a 20°C durante 15 días.
3. Realizar diluciones seriadas con un factor de 0.1
4. Cargar la cámara de Neubauer y contar el número de conidias/ml.
5. Realizar por lo menos cuatro repeticiones por aislamiento.
6. Realizar los cálculos respectivos para obtener la información.

Viabilidad de conidias

1. Sembrar 5 alícuotas de 5 μ l de una suspensión de conidias con una concentración de 10^6 conidias/ml en medio PDA.
2. Incubar a 20°C durante 24 horas.
3. Agregar azul de lactofenol para detener la germinación y distribuirlo uniformemente.

4. Cortar la porción de agar conteniendo la alícuota de la suspensión de conidias y colocarla sobre una lamina portaobjetos. Cubrir con un cubre objetos.
5. Registrar el número de conidias germinadas (aquellas cuyo tubo germinativo sea dos veces mayor al diámetro de la conidia).
6. Por cada aislamiento no se debe hacer menos de cinco repeticiones.

En caso de que el rendimiento sea muy bajo, debido a la pérdida de sus características por ser un aislamiento muy viejo, se recomienda reactivarlo en el insecto hospedante.

CONSERVACIÓN DE HONGOS

La conservación de los hongos consiste en mantenerlos viables, eliminando la necesidad de repiques frecuentes, impidiendo así las mutaciones en general, una de cuyas consecuencias es la pérdida de virulencia. En la actualidad existen varios métodos para conservar los hongos por periodos prolongados, los mismos que implican el uso de material variado.

Existen dos principios de conservación: 1) donde se reduce el metabolismo y 2) donde se induce la dormancia de las conidias o esporas.

La reducción del metabolismo, incluye la conservación mediante bajas temperaturas, uso del aceite mineral, agua estéril, suelo estéril, etc. En la inducción de la dormancia, se incluye el secado sobre sílica gel, la liofilización y el uso de nitrógeno líquido (la criogenia, o sea el mantenimiento a temperaturas por debajo del punto de congelación). Estos últimos métodos requieren de aparatos especiales y de insumos costosos, por ello hemos considerado en esta publicación sólo los que pueden estar al alcance de la mayoría de los investigadores en regiones en vías de desarrollo. Hay otros métodos más económicos, como el uso de aceite mineral, pero no es seguro, porque el hongo puede seguir creciendo en condiciones de desventaja, además, no está garantizada su pureza.

CONSERVACIÓN EN SÍLICA GEL*

El uso de sílica gel es un método de conservación que consiste en extraer la fase líquida de las estructuras. Es un método seguro, si se siguen bien las instrucciones, y fácil de rehabilitar al microorganismo con todos sus atributos (Figura 20).



Figura 20: Colección de hongos entomopatógenos conservados en sílica gel.

* En el CIP hemos adoptado este método por ser el más sencillo, confiable y reproducible en cualquier lugar donde se trabaje con hongos entomopatógenos, pues no requiere de mucha infraestructura.

El procedimiento es el siguiente:

1. Esterilizar en autoclave los tubos de vidrio con tapa rosca de 4 ml de capacidad, con la respectiva identificación incluida dentro del tubo.
2. Colocar sílica gel (6 – 22 mesh, sin indicador) en tres cuartas partes del tubo de vidrio y esterilizar con aire caliente en un horno a 180 °C durante 3 horas.
3. Mantener los tubos en congelación hasta su uso.
4. A un tubo de vidrio conteniendo medio PDA y el hongo en crecimiento, agregar 3 ml de agua destilada estéril.
5. Con la ayuda de un ansa de siembra, retirar todo el desarrollo miceliano del hongo y luego agitarlo en el vortex durante 15 segundos.
6. En una cámara de flujo laminar, utilizando una micropipeta, agregar 500 µl de la suspensión de conidias al tubo con sílica gel, previamente identificado.
7. Poner los tubos con inóculo y sellados con parafilm® en una incubadora a 20 °C por 15 días.
8. Luego de ese lapso, colocar los tubos a 4 °C por el tiempo que se quiera almacenar.

Para la reactivación de los hongos:

1. Tomar unos cuantos cristales de sílica gel, en un ambiente estéril y colocarlos sobre medio de cultivo.
2. Sellar la placa, colocarla a 20 °C y esperar su desarrollo.

CONSERVACIÓN DE HONGOS POR LIOFILIZACIÓN

La liofilización es otro de los métodos de conservación de hongos por tiempo prolongado. Si bien es muy recomendado, requiere contar con un liofilizador, lo que no siempre está al alcance de todos los investigadores.

La liofilización es un proceso de conservación, que también involucra la deshidratación de las conidias o cualquier otra estructura propagativa (micelio, conidias, etc.) (Figura 21).

El proceso es el siguiente:

1. Esterilizar en autoclave tubos con tapa rosca, previamente identificados y con 0.25 cm² de algodón.
2. Al tubo con el medio de cultivo y colonia, agregar 2 ml de una suspensión crioprotectora a base de glucosa y gelatina.



Figura 21: Colección de hongos entomopatógenos conservados por liofilización.

Preparación:

- Un litro de agua destilada con 6 gramos de glucosa.
 - Un litro de agua destilada con 6 gramos de agar.
 - Se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.
3. Añadir al tubo 1 ml de cada preparación.
 4. Con un ansa de siembra separar el cultivo del medio.
 5. Añadir 200 µl de la suspensión de hongos en el tubo estéril.
 6. Cerrar los tubos y llevarlos a – 80 °C de 10 a 15 minutos y luego liofilizarlos por 48 horas.
 7. Retirar los tubos del liofilizador, cerrarlos bien y sellarlos con parafilm® y mantenerlos a 4 °C.

Para la reactivación de los hongos:

1. Abrir el tubo, bajo un ambiente estéril, añadir 1 ml de agua estéril y dejar reposar durante 30 minutos (rehidratación).
2. Tomar una pequeña cantidad de la suspensión y sembrarla en placas de petri con medio de cultivo.

Es conveniente realizar la reactivación de la cepa almacenada antes de empezar a trabajar con cualquier método, pasándola por un insecto hospedante con la finalidad de comprobar su viabilidad y pureza.

MULTIPLICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE SUSTRATOS NATURALES

Los sustratos utilizados varían según la región y la finalidad de la multiplicación. Se han probado arroz pelado, trigo, cebada, maíz partido, hollejo de cereales, pasto seco picado, entre otros (Figura 22).

También se tiene referencias de que el agricultor andino propaga el hongo *Beauveria* en rumas de estiércol (de ganado vacuno, cabrío, lanar o de aves) a un costado del campo y luego lo incorpora.

1. Remojar el sustrato en agua con hipoclorito de sodio al 1% durante 16 horas.
2. Enjuagar varias veces con abundante agua, hasta que ya no se sienta el olor a hipoclorito.
3. Embolsar 800 gramos de sustrato por bolsa y agregar 200 ml de agua destilada.
4. Esterilizar durante 20 minutos a 15 libras de presión por dos días consecutivos.

Preparación del inóculo

1. Preparar un litro de medio PDA líquido y mantener durante tres días en agitación.
2. Sembrar el hongo en el medio.

Inoculación al sustrato

1. Agregar en cada bolsa 20 ml del inóculo, en la cámara de flujo laminar.
2. Sellar las bolsas.
3. Incubar a 20 °C durante siete días.
4. A los siete días, realizar el primer conteo de número de conidias.

Conteo del número de estructuras propagativas

1. Agregar en un vaso de precipitados o en un tubo de ensayo un gramo del sustrato y 10 ml de agua destilada estéril.
2. Agitar enérgicamente, o con un agitador, por espacio de un minuto, para que las conidias se desprendan.
3. Tomar 100 μ l de la suspensión y completar a 1 ml con agua destilada más Tween al 0.1%.
4. Hacer las diluciones necesarias hasta poder contar las conidias en la cámara de Neubauer.
5. Realizar el cálculo correspondiente al peso de la bolsa.



Figura 22: Desarrollo de hongos sobre A) sustrato de arroz y B) sustrato de cebada.

BIOENSAYOS

Se denomina bioensayos o pruebas de patogenicidad a las pruebas que se realizan con organismos vivos, con el objeto de determinar los siguientes parámetros: rango de hospedantes, virulencia, competencia ecológica (comportamiento en condiciones de campo), condiciones que incrementan o reducen la formación de epizootias y las barreras de infección. El desarrollo de un bioensayo requiere del entendimiento tanto del patógeno como del hospedante, de lo contrario se pueden producir resultados inconsistentes. Otros factores que pueden influenciar la viabilidad, virulencia y eficacia de los hongos son los métodos de producción, formulación y aplicación.

Es necesario tener en cuenta que cultivos sucesivos en medios artificiales pueden resultar en una atenuación o pérdida de la virulencia (CL_{50} , TL_{50}). Para evitar estos problemas, cuando sea posible, se debe producir grandes cantidades de inóculo utilizando el aislamiento inicial y almacenarlo. La pérdida de la virulencia depende del aislamiento y especie del patógeno pero frecuentemente se puede recuperar con el pasaje del hongo a través del hospedante apropiado, como se ha demostrado con *Metarhizium anisopliae* (Fargues y Roberts, 1983), *Paecilomyces farinosus*

(Prenevora, 1994) y *Beauveria bassiana* (Wasti y Hartman, 1975) entre otros.

En los bioensayos se deben utilizar insectos provenientes de crianzas en laboratorio, de la misma edad y en buenas condiciones sanitarias. En caso de trabajar con larvas, éstas deben ser seleccionadas y separadas un día antes de la instalación del ensayo y alimentarlas teniendo cuidado de no utilizar productos antifúngicos. Además, las larvas deben estar próximas a mudar, para que lo puedan hacer en el tiempo de espera y no en pleno desarrollo del ensayo.

La inoculación de los insectos se debe realizar por aspersión o inmersión por 10 segundos en la suspensión de conidias.

Los insectos tratados deben ser mantenidos individualmente en incubadora o en ambiente con temperatura constante, de acuerdo a los requerimientos del hongo evaluado, que debe ser observado diariamente. La mortalidad del tratamiento testigo, es decir los insectos tratados con agua destilada estéril, no debe ser mayor al 10 % ni éstos deben presentar signos de micosis. La mortalidad de los tratamientos debe ser corregida mediante la fórmula de Abbott:

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \times 100$$

La suspensión de conidias debe ser obtenida de un cultivo fresco en esporulación, agregándole agua destilada estéril. Con la ayuda de un ansa se debe retirar todo el micelio para que las conidias estén en contacto con el agua. Luego, se agita enérgicamente para su homogeneización. Se deben hacer las diluciones necesarias que permitan un conteo fácil en la cámara de Neubauer, y realizar el cálculo correspondiente de la

suspensión a utilizar. Las evaluaciones se deben realizar diariamente hasta que muera el 100 % de la población, de esta manera se determinará el TL_{50} de los tratamientos.

GLOSARIO

Absorción: penetración de cualquier elemento líquido como en una esponja, embeber.

Acrópeta: se refiere a la posición apical de la conidia más joven.

Aeróbico: proceso en el que se transforma residuos orgánicos de origen animal o vegetal, en presencia de oxígeno.

Aerobio: microorganismos que requieren de la presencia de oxígeno para vivir.

Alcalino: condición química que brinda una alta concentración de iones de hidróxido, pH superior a 7.

Anaerobio: se le dice al organismo que no necesita oxígeno libre para vivir.

Antibiosis: fenómeno biológico en el que existe una detención o destrucción del crecimiento microbiano debido a sustancias producidas por otro ser vivo.

Antibióticos: sustancias producidas por un ser vivo que se oponen al desarrollo de otro ser vivo.

Anamorfo: estado asexual o imperfecto de un hongo.

Antimicrobianos: sustancias que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (antibacterianos, antifungos, etc.).

Antisepsia: operaciones o técnicas encaminadas a crear un ambiente que impida el desarrollo de los microorganismos e incluso pueda matarlos.

Antisépticos: son aquellas sustancias químicas que previenen el crecimiento o acción de los microorganismos ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad.

Apresorio: estructura fungosa en el extremo del tubo germinativo que le sirve de anclaje o para absorber sustancias de su hospedante.

Ascospora: espora propia de hongos Ascomycetos originada por meiosis dentro de un asca.

Asepsia: técnicas empleadas para impedir el acceso de microorganismos al ambiente de trabajo.

Basípeta: se refiere a la posición basal de la conidia más joven, o cerca de la célula conidiógena.

Bioseguridad: políticas y procedimientos adoptados para garantizar la aplicación segura de la biotecnología en la salud y el medio ambiente. Se aplica principalmente al uso seguro de organismos modificados genéticamente.

Células conidiógenas: células que producen conidias.

Clamidospora: estructura de conservación o espora de resistencia.

Conidias: estructuras propagativas no móviles de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.

Conidióforo: hifa especializada, en cuyo extremo apical se insertan los conidios.

Desinfección: proceso de destrucción de los agentes infecciosos.

Desinfectantes: aquellas sustancias químicas que matan las formas vegetativas y no necesariamente las formas de resistencia de los microorganismos patógenos.

Entomopatógenos: patógenos tales como virus, bacterias y hongos, entre otros, que causan enfermedades a diferentes tipos de insectos.

Esporangióforo: hifa especial en cuyo extremo apical se forma un esporangio

Espora de resistencia: espora de pared gruesa que sobrevive en condiciones adversas.

Esporangio: estructura en forma de bolsa que contiene esporas.

Esporangiospora: espora producida dentro de un esporangio.

Esporas: unidad reproductiva de los hongos, que se forma dentro de un esporangio.

Esporulación: proceso que ocurre en los hongos y está relacionado con la producción de esporas, conidias, etc.

Esporoquio: masa de tejido fungoso que contiene conidióforos y conidias.

Esterilización: es el proceso de destrucción de toda forma de vida microbiana.

Estroma: masa de hifas vegetativas sobre las cuales se forman las conidias.

Fase imperfecta: fase asexual de los hongos.

Fase perfecta: en los eumicetos, fase sexual.

Fialide: célula conidiógena en forma de botella, donde se forman las conidias.

Hialino: transparente.

Hifa: cada uno de los filamentos tubulares que constituyen el micelio en todo su espesor, lo cual confiere un aspecto no estratificado.

Himenio: región fértil del hongo.

Hongos: microorganismos cuya nutrición es por ósmosis, se reproducen sexual y asexualmente y viven como saprófitos, como parásitos o en asociación con otros organismos formando micorrizas.

Hospedante: organismo que permite el desarrollo de patógenos (huésped).

Inóculo: cualquier porción del patógeno capaz de producir infección.

Inoculación: proceso mediante el cual un patógeno y un hospedante entran en contacto.

Larva: estado inicial en el ciclo de vida del insecto (estado inmaduro en la metamorfosis de un insecto). Las larvas nacen de los huevos y por lo general tienen el aspecto de un gusano.

Lípidos: sustancias cuyas moléculas constan de glicerina y ácidos grasos.

Metabolismo: actividad bioquímica que ocurre en los seres vivos para llevar a cabo los procesos esenciales para su supervivencia.

Micelio: estructura vegetativa de los hongos, constituida por filamentos llamados hifas.

Microbicidas: sustancias que matan las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas de un microorganismo (bactericida, fungicida, etc.).

Microbiostáticos: sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos (bacteriostáticos, fungistáticos, etc.).

Microorganismo: organismo vivo que vive en diferentes medios.

Morfología: estudio de la forma y estructura externa de los seres vivos.

Patógeno: término que se aplica a cualquier elemento que causa enfermedades. Organismo que causan una enfermedad.

Peritecio: ascocarpo globoso y cerrado provisto de un ostiolo. Propio de hongos Ascomicetos.

Picnidio: cuerpo fructífero globoso con conidias en su interior. Propio de hongos Deuteromicetos.

Propágulo: parte de un microorganismo que puede reproducirse y diseminarse.

Proteína: compuesto orgánico formado por una o más cadenas de aminoácidos.

Rizoide: hifas estériles que se fijan al sustrato.

Saprofito: organismo que vive de materia orgánica muerta o en descomposición.

Sustrato: material sólido distinto del suelo, natural o de síntesis, mineral u orgánico que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando por tanto un papel de soporte para la planta. Se denomina así al material sobre el que se propaga un organismo.

Synema: conidioma más o menos compacto, de hifas vegetativas erectas, que sostienen a las conidias.

Teleomorfo: estado sexual o perfecto de un hongo.

Tóxico: aquello que tiene un efecto dañino y mortal.

Toxina: compuesto que producen los microorganismos y que es venenoso para las plantas y para los animales.

Zigospora: espora de sobrevivencia. Propia de hongos Zygomycetos.

Zoospora: espora asexual provista de flagelos que se moviliza en medio líquido.

LITERATURA CONSULTADA

- Ainsworth, G. 1973. Introduction and keys to higher taxa. In: The fungi: An advanced treatise. Ainsworth, G., F. Sparrow and A. Sussman. Academic Press, New York (IVA): 1-7
- Butt, T.M. and M.S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. In: CAB International 2000. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes (eds A.Navon and K.R.S. Ascher), p 141-195.
- Charnley, A. 1984. Physiological aspects of destructive patogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: Invertebrate-microbial interactions. Anderson, J., A. Rayner and D. Walton. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 229-270.
- Commonwealth Mycological Institute. 1979. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Kew, Surrey, England. *Beauveria bassiana* No. 602; *B. brongniartii* No. 603; *Metarhizium anisopliae* No. 609; *Lecanicillium lecanii* No. 1565; *Paecilomyces farinosus* No. 613; *P. fumosoroseus* No. 614.
- Fargues, J.F. and P.H. Roberts, 1983. Effect of passing through scarabeid hosts on the virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Microbiology 29, 576-583.

- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. In: Annual review of entomology. 23:409-442.
- French, R.E. y T. Hebert. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. 1ª ed., 1ª reimpression. IICA - Serie de libros y material educativo. No. 43, 290 p. San José de Costa Rica.
- Humber, R. 1997. Fungi: Identification. in: Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. Lacey, L (ed.) California (USA). Academic Press. Pp 153 - 185.
- Humber, R. 1997. Fungi: Preservation of cultures. 1997. in: Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. Lacey, L (ed.) California (USA). Academic Press. Pp 269 – 278.
- Humber, R. Revised taxonomy for *Verticillium* species affecting invertebrates. http://www.ppru.cornell.edu/Mycology/catalogs/vert_tax.pdf
- Lacey, L. And W.M. Brooks. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insects. En Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. Lacey, L (ed.) California (USA). Academic Press. Pp 1 - 12.
- Lecuona, R.E, ed. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, 338 p.
- Mateos, P. Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion.htm#indice>
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 63, 95 – 103.
- Pacific Regional Agricultural Programme. 1997. Techniques and media for isolation, culture, storage and bioassay of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. Prap leaflet No. 14.
- Pérez, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR. 296 pp

- Prenerová, E. 1994. Pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* toward *Cephalcia abietis* eonymphs (Insecta, Hymenoptera): enhancement of bioactivity by in vivo passaging. *Journal of Invertebrate Pathology* 64,62-64.
- Samson, R.A., H.C. Evans and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Verlag, Berlin.
- Tanada, Y. And H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press, San Diego, California, USA: 666p.
- Wasti, S.S. and G.C Hartmann. 1975. Experimental parasitisation of larvae of the gipsy moth, *Porthetria dispar* (L.) with the entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuill. *Parasitology* 70,341-346.



La Vision del CIP

El Centro Internacional de la Papa (CIP) contribuir a reducir la pobreza y el hambre, a mejorar la salud humana, desarrollar sistemas de sustento rurales y urbanos sostenibles y robustos, y mejorar el acceso a los beneficios de los conocimientos y las tecnologías modernas. El CIP, un Centro Mundial, afrontar estos desafíos ejecutando y convocando investigaciones y alianzas que se centren en la papa, el camote, las ra ces y los tub rculos andinos, y los sistemas de monta a y otras zonas menos favorecidas en donde el CIP puede contribuir a un desarrollo humano saludable y sostenible.

www.cipotato.org

FUTURE
HARVEST



El CIP es un centro perteneciente a Future Harvest (Cosecha del Futuro), y recibe la mayor parte de su financiamiento de un grupo de gobiernos, fundaciones privadas y organizaciones internacionales y regionales que conforman el Grupo para la Investigación Agrícola Internacional, más conocido por sus siglas en inglés CGIAR.

www.futureharvest.org · www.cgiar.org